

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica



Genoma mitocondrial, mitocondriopatías y cáncer

Alberto Cruz Bermúdez

Madrid, 2015

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Genoma mitocondrial, mitocondriopatías y cáncer

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Alberto Cruz Bermúdez

Licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Madrid

Directores de la Tesis:

Dr. Rafael Garesse Alarcón

Catedrático de Universidad

Dr. Miguel Fernández Moreno

Profesor Titular

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”. CSIC-UAM.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

Rafael Garesse Alarcón, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la UAM y **Miguel Fernández Moreno**, Profesor Titular de Bioquímica de la UAM,

como Directores de Tesis, CERTIFICAN:

Que Don **Alberto Cruz Bermúdez** con D.N.I.: 47289880V, licenciado en Biología, ha realizado, bajo la dirección de los Directores de Tesis, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, el trabajo titulado:

Genoma mitocondrial, mitocondriopatías y cáncer

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 23 de Noviembre de 2015

Fdo. Rafael Garesse Alarcón
Director de la Tesis
Catedrático de Bioquímica

Madrid, 23 de Noviembre de 2015

Fdo. Miguel Fernández Moreno
Director de Tesis
Profesor Titular de Bioquímica

A mi Familia

*El tiempo no es importante,
sólo la vida es importante*

- El quinto elemento

"FINAL".doc



FINAL.doc!



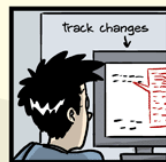
FINAL_rev.2.doc



FINAL_rev.6.COMMENTS.doc



FINAL_rev.8.comments5.
CORRECTIONS.doc



FINAL_rev.18.comments7.
corrections9.MORE.30.doc



FINAL_rev.22.comments49.
corrections.10. #@\$%WHYDID
ICOMETOGRADSCHOOL?????.doc

JORGE CHAM © 2012

WWW.PHDCOMICS.COM

AGRADECIMIENTOS

El momento de escribir los agradecimientos ha llegado, esto no puede significar otra cosa que me acerco a ese reto que hace 4 años parecía tan lejano, la tesis doctoral. Aunque parezca mentira, he tenido estas líneas muy presentes a lo largo de estos años, tengo mucho que agradecer, solo lamento no poder transmitir con este texto todo lo bueno que he recibido y estar a la altura de las grandes personas que he conocido. Gracias a todos los que me habéis conducido a este momento, he sido muy afortunado.

En primer lugar a mis directores de tesis Rafa y Miguel, muchas gracias por la oportunidad de formar parte del B19, por confiar en mí desde el primer minuto y en definitiva por enseñarme un oficio. Sinceramente, he tenido mucha suerte de caer en vuestras manos, estos han sido los mejores años y eso os lo debo a vosotros. De vosotros me llevo además un referente de inteligencia y de trabajo.

Me gustaría agradecer especialmente a Belén Bornstein, gracias por introducirme en el B19 cuando andaba tocando puertas buscando un grupo donde empezar, sin ese primer paso clave no estaría aquí. Muchas gracias además por tu simpatía y por tu cariño.

A la plantilla oficial del B19 y a todo el mundo que alguna vez haya pasado por allí, muchas gracias por hacer del B19 un sitio que vale la pena. A Lucy, por tu simpatía y ánimo en los comienzos. Muchas gracias a Paula, si de alguien he aprendido algo es de ti. Si supiese la mitad de lo que me enseñaste sabría el doble que la mayoría. Trabajadora incansable, te deseo lo mejor. A Rosana, mucho trabajo de esta tesis es tuyo, trabajar contigo ha sido un placer. Cristina “Lab Manager”, una persona despistada como yo no hubiese llegado a nada sin un poco de orden en el laboratorio, muchas gracias. Esther, gracias por toda la ayuda recibida (y la que sigo recibiendo) y por alegrar el laboratorio. De ti me llevo además una serie de anacronismos que añadir a mi vocabulario. Fran, gracias por tus palabras de apoyo y por fomentar el buen ambiente del labo, algún día volveré al fútbol. Teresa, gracias por la simpatía derrochada, el “road trip” y nuestras aventuras por EEUU de los mejores recuerdos que tengo. Sara, ánimo, vales mucho más de lo que piensas, sigue trabajando duro, gracias por todo lo que me has ayudado tanto dentro como fuera del B19. Y muy especialmente a Ramiro, mil gracias por todo, este trabajo lo hemos sacado adelante entre los dos, codo con codo, peleándolo día a día. Muchas gracias por hacerlo todo tan fácil. De ti me llevo además un gran amigo.

A Marga y Juan del B20, por su apoyo, por sus consejos en los seminarios conjuntos y por su ayuda cuando la he necesitado. Quisiera agradecer también a todo el mundo que ha pasado por el B20 y en mayor o menor medida me ha ayudado. Lidia y Bego las técnico de laboratorio más divertidas, contigo Bego tuve el placer de trabajar en mi etapa final. Berta, una lástima no haber coincidido más, eras el buen rollo personificado. Sara, mucho ánimo, que no te engañen, el comienzo es lo complicado, luego ya es cuesta abajo. Pedro, no he conocido persona más noble, debes estar orgulloso, gracias por los cientos de conversaciones que hemos tenido, tanto científicas como filosóficas y por dejarme conocer a ese Peter molón con el que tanto me he divertido. A Leti, por ser mi amiga en mayúsculas, mi apoyo incondicional y con permiso de tu marido, “mi cari” favorita. Gracias por estar ahí.

Gracias a la gente que ha formado parte del Departamento de Bioquímica por generar un ambiente de trabajo excelente en el que se respira buen rollo y las horas de trabajo no pesan. Ver gente por los pasillos a las 8 de la tarde anima a seguir. A Marcos del B17, muchas gracias por tu apoyo sincero, te deseo lo mejor. Antoñito, un auténtico figura, yo te votaría como alcalde de Mora, tienes un carisma especial. Raulito, un profesional de la ciencia y una máquina de trabajar, gracias por tu humor. A Lourdes, Miss Simpatía del departamento, obligaría por ley a una persona como tú por grupo. Las Barbacoas “over night” merecen comentario aparte: espectaculares, son ya una tradición que espero no acabe (pretendo no perderme una).

A todos los servicios de apoyo a la investigación tanto del dpto. de Bioquímica como del IIB. Es maravilloso no tener que preocuparse de hacer reactivos de biología molecular, ni lavar, ni autoclavar... etc.). A Laura Molero del servicio de citometría por las incontables horas de trabajo extra que le he dado, por estar siempre disponible para ayudar con una sonrisa y en definitiva por ser una profesional. Ana, aka “la confo”, aunque no he tenido que trabajar mucho con imágenes, las pocas veces que he necesitado algo siempre has estado ahí dispuesta a ayudar derrochando simpatía.

En especial muchas gracias a Luis del Peso por su ayuda con los experimentos en hipoxia, siempre dispuesto a echar una mano. Sin lugar a dudas muchas gracias a Miguel Quintanilla, me alegro mucho de haber colaborado contigo, gracias por la alegría que transmites, por todo lo que me has enseñado, por tus consejos y por las charlas distendidas, un placer. Muchas gracias a la gente de Puerta de Hierro, por la paciencia infinita en la escritura de esta tesis y el buen recibimiento, espero no defraudar y aprovechar la oportunidad excepcional que me brindáis.

A mis amigos, apoyo y válvula de escape necesaria. A mis compañeros de facultad, Ale, Mar, Hugo y Cornejo, con vosotros he compartido toda la carrera, no hubiese sido capaz de terminarla sin vosotros y no solo por ser mis seguidores de apuntes. Aunque no erais mis “amigos de verdad” habéis sido mis verdaderos amigos. A los “adoptados” de Talavera, Luis, George, Negro, Champo y Chechu, gracias por todas las risas, como una ciudad tan modesta puede albergar tanta genialidad. A ti Kike, gracias por ser como eres, espero no perderte nunca, haces honor a tu apellido. Manu y Lucia, aunque no hablemos lo suficiente os reservo un cariño especial, muchas gracias por vuestro apoyo, habéis sido clave en la parte más crítica de este viaje. Gracias a todos los desconocidos que en pequeñas “conversaciones de bar” me han animado a seguir en ciencia. Aunque os parezca mentira la ciencia no solo nos interesa a “cuatro ratas de laboratorio”.

Y por último, a mi familia. Muchas gracias a mis tíos y a mis primos por animarme siempre a tirar hacia adelante. A mi hermana por su apoyo y cariño. A mi hermano, por apoyarme cuando lo he pasado mal, por aconsejarme siempre bien y por ser un modelo a seguir, sin duda en ese olimpo de gente extraordinariamente inteligente.

Y por encima de todo, muchas gracias a mis padres, por todo vuestro amor y esfuerzo. Esta tesis y todo lo necesario para llegar hasta aquí ha sido posible gracias a vuestro sacrificio.

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN:

La mitocondria resulta clave para numerosas funciones celulares como la obtención de energía y la señalización celular. Este orgánulo alberga su propio genoma que contiene la información únicamente para 37 genes cuya función es esencial para el sistema OXPHOS. Cambios en la secuencia del ADNmt pueden producir desde enfermedades severas (mutaciones) a no tener manifestación alguna (polimorfismos silentes). El sistema de cíbridos transmitocondriales representa un modelo de estudio ampliamente utilizado ya que permite aislar el efecto producido por diferentes variantes de ADNmt.

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) está considerada como la patología mitocondrial más común. En ella, 3 mutaciones (m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C), todas ellas afectando al Complejo I, explican el 95% de los casos. A pesar de ser una enfermedad considerablemente estudiada existen preguntas sin resolver. En esta tesis describimos el primer caso de un paciente portador de 3 mutaciones LHON en su molécula de ADNmt (m.11778G>A, m.14484T>C y m.11253T>C). El estudio molecular sobre cíbridos demostró la ausencia de sinergia entre estas mutaciones, presentando todos los cíbridos de pacientes LHON una afectación moderada y sugiriendo un mecanismo de acción común.

La función mitocondrial, además de ser clave en las patologías mitocondriales clásicas, ha sido implicada en otras como el cáncer. En este sentido, el efecto Warburg (glucólisis aerobia) ha sido descrito como uno de los sellos característicos de las células tumorales. Por otro lado, se han encontrado mutaciones en el ADNmt en la mayoría de tumores, aunque su papel es aún controvertido.

Para estudiar el proceso de reprogramación metabólica se estudió la función mitocondrial en una serie de 4 líneas celulares epiteliales, MCA3D, PB, A5 y CarC con un potencial tumorigénico creciente. Los resultados mostraron un aumento de la tasa glucolítica a medida que aumenta la tumorigenicidad de las líneas celulares, pero sin una afectación de la función mitocondrial. Estos resultados apoyan la teoría de que la mitocondria no tiene por qué estar afectada necesariamente en las células tumorales, pero sí el metabolismo energético.

Por otro lado, sumándose a esta tendencia natural de acumulación de mutaciones en tumores, la línea parental 143B de osteosarcoma humano (sobre la que se realizaron los cíbridos LHON) posee una mutación en *MT-COI* en el ADNmt. Curiosamente, la eliminación del ADNmt o la sustitución de este ADNmt por una molécula sin mutaciones o con la mutación severa m.8363G>A eliminaban su tumorigenicidad, sugiriendo que la presencia de mutaciones moderadas eran necesarias para mantener el fenotipo tumoral. Esta hipótesis fue confirmada mediante la utilización de cíbridos portadores de las 3 mutaciones primarias LHON y sus controles de haplogrupo. Los principales mecanismos alterados que explica estas diferencias en función de ADNmt fueron una mayor producción de ROS y un aumento de resistencia a apoptosis.

SUMMARY:

Mitochondria play a key role in many cellular functions such as energy production and cell signaling. This organelle has its own genome containing exclusively the information for 37 genes whose function is essential for the OXPHOS system. Changes in mtDNA sequence produce from severe diseases to silent polymorphisms. The transmitochondrial cybrid system represents a widely used study-model to isolate the effect of different variants of mtDNA.

The Leber's hereditary optic neuropathy is considered the most common mitochondrial pathology in which three mutations (m.3460G> A, m.11778G> A and m.14484T> C), all of them affecting complex I, account for 95% of the cases. Despite being a significantly studied disease some questions remain unresolved. In this thesis we describe the first case of a patient with 3 LHON mutations (m.11778G> A, m.14484T> C and m.11253T> C). The molecular study on cybrids demonstrated the absence of synergy for these mutations. All cybrids harboring LHON mutations showed a similar moderate impairment, suggesting a common mechanism of action.

Mitochondrial function, besides being a key factor in classical mitochondrial pathologies, has been implicated in other pathologies like cancer. In this aspect, the Warburg effect has been described as one of the hallmarks of tumor cells. Furthermore, mutations in mtDNA for most tumors have been found, although its role is still controversial.

To study the metabolic reprogramming process we studied the mitochondrial function in a series of 4 epithelial cell lines, MCA3D, PB, A5 and CarC with increasing tumorigenic potential. The results showed an increase in glycolytic function with increasing tumorigenicity of the cell lines, but no affectation of mitochondrial function was detected. These results support the theory that mitochondria are not necessarily affected in tumor cells, but the energy metabolism is.

Furthermore, adding to this natural tendency of accumulation of mutations in tumors, the osteosarcoma 143B parental line (on which the LHON cybrids were performed) possesses a mutation in *MT-COI* on mtDNA. Interestingly, mtDNA removal or replacement by a wild type mtDNA or with the severe mutation m.8363G>A hampered the tumorigenicity, suggesting that the presence of moderate mutations were necessary to maintain the tumorigenic phenotype. This hypothesis was confirmed using cybrids carrying the 3 primary LHON mutations and haplogroup controls. The main altered mechanism explaining these differences depending on mtDNA were a higher ROS production and an increased apoptosis resistance.

INDICE

ABREVIATURAS:	25
1. INTRODUCCIÓN.....	29
1.1 HISTORIA Y ORIGEN DE LA MITOCONDRIA	29
1.2 GENÉTICA MITOCONDRIAL	30
1.3 FUNCIÓN MITOCONDRIAL	32
1.3.1 Ciclo de Krebs (Mitocondria como centro metabólico)	32
1.3.2 Sistema OXPHOS	33
1.3.3 Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).....	36
1.3.4 Homeostasis del Calcio	38
1.3.5 Procesos Biosintéticos	38
1.3.6 Apoptosis	39
1.3.7 Mitocondria como centro señalizador	40
1.4 PATOLOGIA MITOCONDRIAL	41
1.4.1 ADN nuclear.....	41
1.4.2 ADNmt	43
1.4.3 Haplogrupos	44
1.4.4 Cíbridos como sistema modelo	44
1.4.5 Fenotipo mitocondrial severo- Mutaciones en ARNt - MERRF	45
1.4.6 Fenotipo mitocondrial leve- Mutaciones en proteínas - LHON	46
1.5 MITOCONDRIA Y CANCER	47
1.5.1 Efecto Warburg	47
1.5.2 ADNmt y Cáncer.....	48
2. OBJETIVOS.....	51
3. MATERIALES, METODOS y RESULTADOS	53
3.1 CAPITULO 1	55
3.2 CAPITULO 2	57
3.3 CAPÍTULO 3	59
4. DISCUSIÓN.....	65

4.1 PREVIO	65
4.2 ESTUDIO DE MUTACIONES LHON	66
4.2.1 Actividad del Complejo I	66
4.2.2 Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).....	67
4.2.3 Potencial de membrana interna mitocondrial	68
4.2.4 Niveles de ATP	68
4.2.5 Consumo de oxígeno	68
4.2.6 Calcio en LHON.....	69
4.2.7 Ensamblaje del Complejo I	70
4.2.8 Relación estructura-función en el Complejo I.....	70
4.2.9 Masa mitocondrial y número de copias de ADNmt	71
4.2.10 Apoptosis en LHON.....	71
4.2.11 Haplogrupos	72
4.2.12 Factores ambientales	72
4.2.13 Mecanismo de acción	73
4.3 MITOCONDRIA Y CÁNCER	74
4.3.1 Visión global	74
4.3.2 Estudios de tumorigenicidad con líneas de híbridos.....	76
4.3.3 Señal retrograda en cáncer.....	77
4.3.4 Implicaciones clínicas - Futuras direcciones	79
5. CONCLUSIONES.....	83
6. BIBLIOGRAFIA.....	87
7. ANEXOS.....	108

ABREVIATURAS:

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNn: ADN nuclear

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN de transferencia

BrdU: 5'-bromo-2'-deoxiuridina

BSA: Albumina de suero bovino

Ca²⁺ cit: Calcio citosólico

Ca²⁺ mt: Calcio mitocondrial

Células p0: Células que carecen de ADNmt

CoQ: Coenzima Q, Ubiquinona

CPEO: Oftalmoplejía externa progresiva crónica

CytC: Citocromo C

DCFHDA: Diclorofluoresceína diacetato

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil sulfóxido

Drp: Dynamin-related protein

FBS: Suero fetal bovino

FCCP: Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona

HSP: Promotor de la cadena pesada del ADN mitocondrial

LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber

LS: Síndrome de Leigh

LSP: Promotor de la cadena ligera del ADN mitocondrial

MELAS: Miopatía, Encefalopatía, Acidosis Láctica y Accidentes cerebrovasculares (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic acidosis, And Stroke-like episodes)

MERRF: Epilepsia Mioclónica y Fibras Rojas Rasgadas (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers)

Mfn: Mitofusina

MILS: Síndrome de Leigh Heredado por vía Materna (Maternally Inherited Leigh Syndrome)

MIMP: Potencial de membrana interna mitocondrial (Mitochondrial inner membrane potential)

MME: Membrana Mitocondrial Externa.

MMI: Membrana Mitocondrial Interna.

MNGIE: Síndrome de encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial (Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalopathy)

NARP: Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa (Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa)

OXPHOS: Fosforilación Oxidativa (OXidative PHOSphorylation)

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno (Reactive Oxygen Species)

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA Y ORIGEN DE LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo celular semiautónomo y dinámico que contiene su propio genoma, estando presente en la mayoría de células eucariotas. La mitocondria resulta de vital importancia para numerosas funciones celulares como la obtención de energía, la señalización celular, la apoptosis y la biosíntesis de moléculas (Nunnari and Suomalainen, 2012).

El descubrimiento de las mitocondrias fue un hecho colectivo, realizado de forma paralela a lo largo de varias décadas por diferentes científicos. Las primeras descripciones de este orgánulo celular, denominado de diversas formas en aquella época, aparecen en la literatura a finales del siglo XIX.

A finales del siglo XIX Richard Altmann (Altmann, 1894) describe una serie de corpúsculos a los que denomina “bioblastos” que observa mediante una tinción especial que incluye fucsina (Figura 1). De una forma especulativa, pero aproximándose a la realidad que hoy

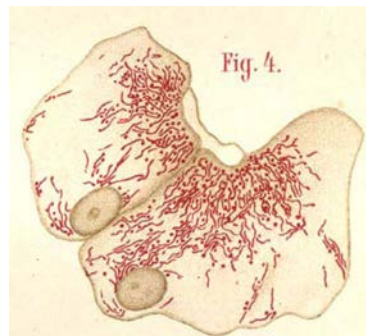


Figura 1: Ilustración de Bioblastos en células de hígado de rana descritas por Richard Altmann a finales del siglo XIX.

conocemos de las mitocondrias, describe estos orgánulos como “organismos elementales”, parecidos a bacterias de vida libre, con su propio metabolismo, que secretan varias sustancias y que podían transformarse en bastones o fibras. Las teorías de Altmann fueron rechazadas por sus contemporáneos y los “bioblastos” contemplados como artefactos técnicos. No fue hasta unos años después, gracias a la mejora de la tinción con cristal violeta realizada por Carl Benda a comienzos de 1889, cuando la entidad de estos orgánulos se estableció firmemente, acuñándose por primera vez el termino Mitocondria (del griego *Mitos*, “hilo” y *Khondrion*, “pequeño granulo”) (O’Rourke, 2010; Sapp, 2007). En 1913 Warburg descubre su asociación con enzimas de la cadena respiratoria (Warburg, 1913) aunque previamente, en 1912, Kingsbury había relacionado estos orgánulos con la respiración celular (Kingsbury, 1912). En 1934 fueron aisladas por primera vez a partir de homogenizados de hígado y en 1948 Hogeboom, Schneider y Palade establecen definitivamente la mitocondria como el lugar donde se produce la respiración celular (Hogeboom et al., 1948).

Más allá de su historia, para entender la biología de este orgánulo hay que ser consciente de su origen evolutivo. Las mitocondrias, tal y como las conocemos actualmente, provienen de alfa-proteobacterias incorporadas a una célula eucariota ancestral (origen endosimbionte de las mitocondrias). Esta teoría, ya sugerida en alguna de las primeras descripciones del organulo como la de R. Altmann, fue propuesta a principios del siglo XX por Ivan E. Wallin (Wallin, 1926) y finalmente definida por Lynn Margulis en los años setenta (Margulis, 1971). Aunque todavía no existe consenso en la naturaleza del huésped y como ocurrió esa simbiosis, el origen exógeno de las mitocondrias es ampliamente aceptado y sustentado en numerosas evidencias científicas. Durante la coevolución de esta alfa-proteobacteria original con el ancestro eucariota se han producido numerosos cambios en ambos elementos. De este

modo, muchas de las funciones presentes originalmente en el ancestro bacteriano se han perdido, estando el genoma mitocondrial reducido únicamente a poco más de 16kB en metazoos con información para 13 proteínas de las 2000 que aproximadamente representan su proteoma. Por el contrario, han adquirido funciones nuevas relevantes para la célula eucariota como hoy la conocemos. (Gray, 2012; Zimorski et al., 2014).

Con el tiempo, la mitocondria quedó perfectamente integrada en la célula huésped, resultando clave en numerosos procesos y siendo necesaria una comunicación regulada. Esta interdependencia entre núcleo/célula y mitocondria es de vital importancia para comprender la biología de la célula y consecuentemente la patofisiología de muchas enfermedades.

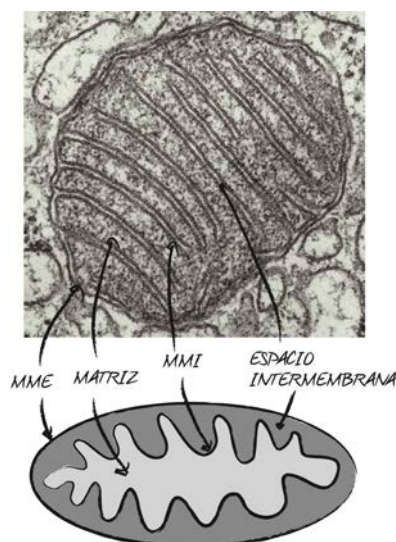


Figura 2: Estructura Mitocondrial. Microscopia electrónica y esquema de una mitocondria.

A nivel estructural, como su ancestro procariota, las mitocondrias están formadas por dos membranas; Membrana Mitocondrial Externa (MME) relativamente permeable a moléculas <10KDa, y la Membrana Mitocondrial Interna (MMI), con una restricción mayor al intercambio de moléculas, clave para el establecimiento de un gradiente electroquímico. Estas membranas definen dos espacios claramente diferenciados, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial en el interior (Figura 2).

La imagen tradicional de las mitocondrias como orgánulos discretos y estáticos ha sido sustituida en las últimas décadas por una visión mucho más dinámica, en la que las mitocondrias forman una red en constante remodelación que se extiende a lo largo de la célula, con procesos de fusión y fisión.

1.2 GENÉTICA MITOCONDRIAL

El desarrollo de la microscopia electrónica hace 50 años permitió el hallazgo de genomas circulares, de pequeño tamaño (5 μ m) en mitocondrias aisladas de ratón y pollo (Nass, 1966). La circularidad del ADN mitocondrial (ADNmt) y la escasez de proteínas de unión a éste en comparación con el ADN nuclear (ADNn) que forma nucleosomas refuerza la teoría endosimbionte para el origen de las mitocondrias.

El ADNmt humano es una molécula de ADN de doble cadena, circular, de 16568 pares de bases, cuya secuencia completa fue publicada en 1981 (Anderson et al., 1981), revelando unas características que se explican una vez más a través de su origen evolutivo. Es un genoma compacto, con apenas espacios intergénicos y sin intrones. El ADNmt contiene la información para un número reducido de genes, únicamente 37, pero cuya función es esencial para el sistema OXPHOS (Figura 3).

Estos genes incluyen: trece proteínas de los complejos: siete pertenecen al complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), una al complejo III (CYB), tres al complejo IV (COI, COII, COIII) y dos al Complejo V (ATP6, ATP8).

El ADNmt contiene además dos ARN ribosómicos (12S y 16S) y veintidós ARN de transferencia para el sistema de traducción mitocondrial. Más allá de estos genes clásicos, en los últimos años se han descrito una nueva serie de pequeños ORFs en la secuencia del ADNmt que codifican polipéptidos con funciones señalizadoras, como Humanina o MOTS-c (Lee et al., 2013, 2015).

La proporción de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente: una de ellas es rica en residuos de guanina, con una mayor densidad, denominándose cadena pesada (H), mientras que la otra en relación, se denomina cadena ligera (L). En la única región no codificante, que se denomina D-Loop en mamíferos, se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (O_H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP) (Agaronyan et al., 2015).

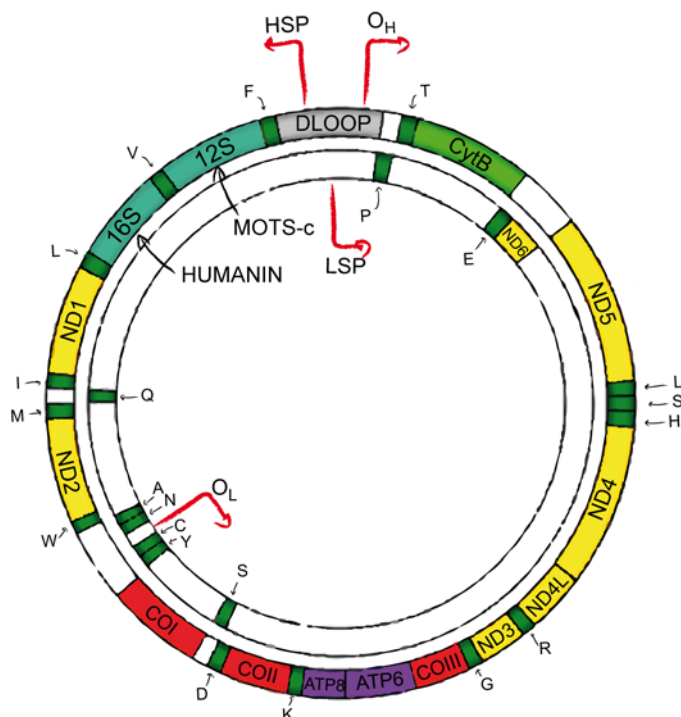


Figura 3: Representación esquemática del ADNmt humano. Circunferencia externa e interna representan la cadena pesada y ligera respectivamente. Genes codificantes representados con diferentes colores, (ARNt en verde oscuro, ARNr 12S y 16S en azul, Subunidades del Complejo I en amarillo, Complejo III en verde, Complejo IV en rojo y Complejo V en morado) región DLOOP en gris.

El ADNmt es especialmente susceptible a acumular cambios comparado con el ADN nuclear. La teoría clásica explica este fenómeno a través de un daño oxidativo mayor debido a una mayor cercanía del ADNmt a la fuente más importante de ROS y a los poco eficientes mecanismos de reparación del ADNmt (Greaves et al., 2012). Sin embargo, estas teorías han sido recientemente cuestionadas, siendo más probable la acumulación de estas mutaciones debida a defectos en la replicación que a un daño oxidativo superior (Itsara et al., 2014).

El efecto de estos cambios en la secuencia mitocondrial varía desde mutaciones que producen enfermedades severas, a polimorfismos silentes. El ADN mitocondrial es transmitido estrictamente por línea materna (Pyle et al., 2015). Siguiendo esta línea hacia atrás, en busca de la “madre ancestral” o “Eva mitocondrial” podemos definir cómo se han ido acumulando estas variaciones. El conjunto de estos cambios, en principio neutros, acumulados a lo largo de la dispersión de las poblaciones humanas desde su origen africano hace 200,000 años se conoce como haplogrupos mitocondriales (Figura 4).



Figura 4: Haplogrupos y su distribución. Esquema de la evolución de los principales haplogrupos europeos desde su origen africano

Una característica clave del genoma mitocondrial es su presencia en alto número de copias por célula (10-1000), condición conocida como poliplasmia, en la que se pueden dar dos situaciones: homoplasmia cuando todas las moléculas presentes son idénticas o heteroplasmia cuando coexisten diferentes variantes de ADNmt. Esta propiedad de la genética mitocondrial es clave para entender la patogenia producida por mutaciones en el ADNmt ya que provoca un fenómeno conocido como “efecto umbral”, en el que el fenotipo de una determinada mutación no solo depende de la severidad de esta, sino que esta modificado por el porcentaje de moléculas de ADNmt que la presentan. Esto permite un efecto mucho más gradual que en mutaciones nucleares y complica aún más la relación genotipo-fenotipo de estas enfermedades.

Por último, otra característica de la genética mitocondrial es que las moléculas de ADNmt pueden replicar de manera independiente al ciclo celular, repartiéndose al azar durante la mitosis, fenómeno que se conoce como segregación mitótica, pudiendo dar como resultado células hijas con distinto contenido de ADNmt.

1.3 FUNCIÓN MITOCONDRIAL

1.3.1 Ciclo de Krebs (Mitocondria como centro metabólico)

Una de las principales funciones de la mitocondria es su papel como centro metabólico. Así, ésta alberga el ciclo de Krebs, también conocido como ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 5).

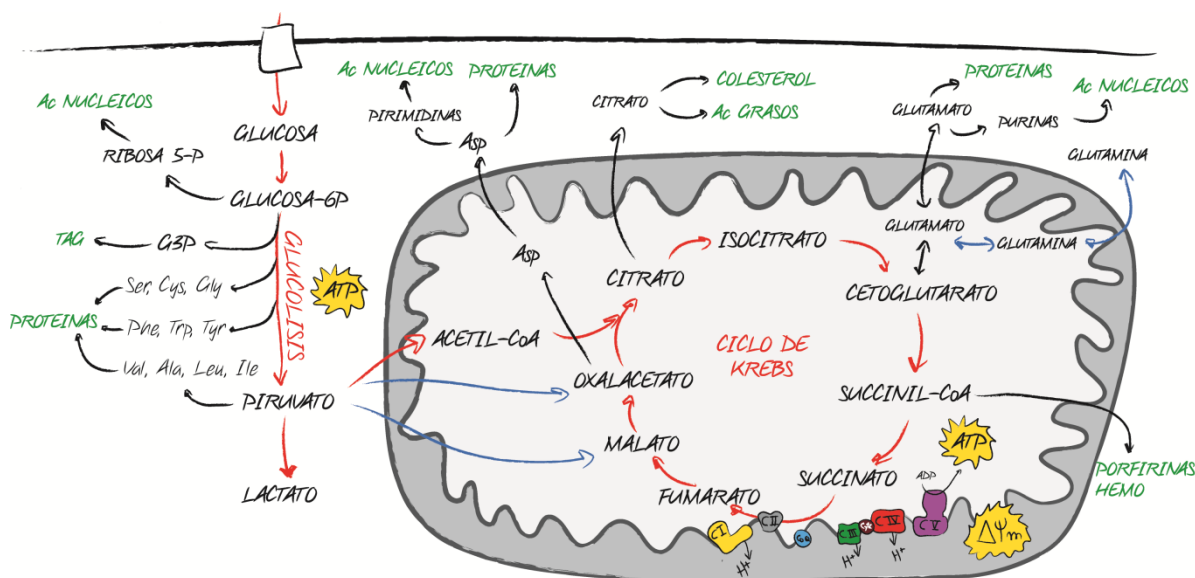


Figura 5: Mitocondria como centro metabólico. Representación esquemática de la glucólisis y el ciclo de Krebs. En rojo se muestran las principales rutas catabólicas que conducen a la oxidación parcial de la glucosa a lactato (Fermentación Láctica) o a su oxidación completa a CO_2 a través del ciclo de Krebs y el sistema OXPHOS. En Verde diferentes productos anabólicos derivados de las rutas anteriores (que darán lugar a Ácidos nucleicos, Ácidos Grasos, Aminoácidos etc.) En azul principales reacciones anapleróticas.

En este ciclo, se oxida el acetil-CoA procedente de diferentes rutas catabólicas (glucólisis, β -oxidación de ácidos grasos y desaminación de aminoácidos) hasta CO_2 , generando cofactores reducidos $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 que posteriormente serán utilizados en el sistema OXPHOS para el mantenimiento del potencial de membrana y la producción de ATP. Por lo tanto, el ciclo de Krebs y el sistema OXPHOS están estrechamente relacionados, sin olvidar que el complejo II de la Cadena de Transporte de Electrones (CTE) forma parte del ciclo de Krebs (Succinato Deshidrogenasa). Más allá de su importancia en el catabolismo de los nutrientes, algunos de los intermediarios del ciclo son precursores biosintéticos de aminoácidos y nucleótidos (oxalacetato y α -cetoglutarato), ácidos grasos y esteroides (citrato), porfirinas (succinil-CoA) y, en tejidos gluconeogénicos, glucosa (oxalacetato o piruvato). Para reponer estos intermediarios utilizados en rutas biosintéticas, existen además reacciones anapleróticas como la glutaminólisis que proporciona glutamato para reponer α -cetoglutarato, así como la conversión de piruvato en malato por la enzima málica o en oxalacetato por la piruvato carboxilasa.

Incluso los niveles de alguno de estos intermediarios actúan como señalizadores, como es el caso de la proporción de α -cetoglutarato/succinato, clave para la activación de PHDs (Prolilhidroxilasas) que regulan la estabilidad de HIF1alpha (Bénit et al., 2014) o como los intermediarios Acetil-CoA y Succinil-CoA que pueden ser utilizados para producir modificaciones post-traduccionales en diversas proteínas regulando su función (Weinert et al., 2013).

1.3.2 Sistema OXPHOS

En la mayor parte de las células, la mayoría del ATP celular es producido en la mitocondria por el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) formado por la Cadena de Transporte de Electrones (Complejos I, II, III y IV más dos transportadores de electrones Coenzima Q y Citocromo C) y el Complejo V o ATP sintetasa (Figura 6). La Cadena de Transporte de Electrones es responsable de la oxidación de los cofactores reducidos $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 procedentes del catabolismo de los nutrientes celulares, cediendo en primer lugar sus electrones a los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico respectivamente, que en última instancia reducen el O_2 a H_2O a través del complejo IV.

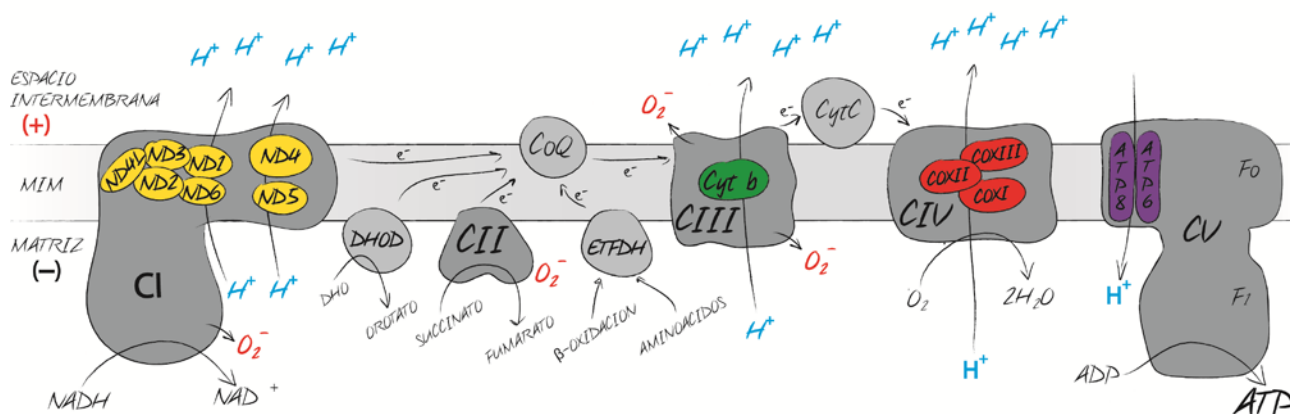


Figura 6: Esquema del sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS). En gris oscuro los complejos clásicos del sistema OXPHOS (CTE: Complejos I-IV mas el Complejo V) con las subunidades codificadas en el ADNmt con el mismo código de colores que en figura 3. Los coenzimas reducidos provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente al O_2 . El gradiente de protones generado es utilizado por el Complejo V, ATP sintetasa, para la producción de ATP. DHOD: Dihidroorotato deshidrogenasa. ETFDH: Electron-Transferring-Flavoprotein Dehydrogenase. CoQ: Ubiquinona. CytC: Citocromo C.

La transferencia de electrones de unos transportadores a otros, que se realiza de forma secuencial a favor de potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de H^+ por los complejos I, III y IV desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando así un gradiente electroquímico (-150 a -180mV) (Ψ_m , Potencial de membrana). La disipación de este gradiente a través del Complejo V se utiliza para la síntesis de ATP. Esta reacción es reversible y la ATP-sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP.

Existe otra proteína situada en la membrana interna mitocondrial, La enzima ETFDH (Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase) que aunque no es considerada habitualmente como un complejo más de la cadena de transporte de electrones realiza la transferencia de electrones desde numerosas flavoprotein-deshidrogenasas al CoQ, relacionando así la producción de ATP con el catabolismo de aminoácidos y la β -oxidación (Cornelius et al., 2012; Ghisla and Thorpe, 2004). De forma similar a defectos en los complejos de la CTE, fallos en su correcto funcionamiento están asociados a alteraciones metabólicas con fenotipos variables (síndromes neuromusculares, miocardiopatías, acidosis, etc.), a los que se le añaden otros específicos como la acumulación excesiva de lípidos (Grünert, 2014).

La forma que tienen los complejos de la CTE de relacionarse entre sí ha sido materia de debate durante las últimas décadas, existiendo actualmente dos modelos. Según el modelo “fluido”, los complejos individuales difundirían libremente por la MIM colisionando de forma aleatoria propiciando así las reacciones de óxido-reducción entre los componentes de la CTE. En contraposición a éste, el modelo “sólido” propone que los complejos OXPHOS están organizados en estructuras de magnitud superior conocidos como supercomplejos o respirasomas. Se han encontrado diferentes combinaciones para estos supercomplejos, I+III+IV, I+III, III+IV en las que nunca aparecen el Complejo II o V. Actualmente, se acepta que probablemente ambos modelos sean compatibles e intercambiables, dando lugar a un modelo consenso de “plasticidad” entre ambos en el que los supercomplejos tienen un papel fisiológico *in vivo* (Lapiente-Brun et al., 2013). La posibilidad de ordenar los complejos de la CTE en estas estructuras presenta la ventaja de una transmisión más eficaz de los electrones, con la consecuente disminución de la producción de ROS. Además, si estos supercomplejos son modulables de forma fisiológica, también lo sería la producción de ROS y su señalización.

1.3.2.1 Complejo I

La NADH deshidrogenasa, NADH:ubiquinona oxidorreductasa o Complejo I, es el componente de mayor tamaño del sistema OXPHOS. Es el punto de entrada de los electrones desde el $NADH+H^+$ a la CTE, catalizando la transferencia de electrones entre el $NADH+H^+$ a la CoQ y bombeando 4 protones al espacio intermembrana de forma acoplada a la reacción redox. Es responsable del 40% de la fuerza protón motriz y es la mayor fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la mitocondria (Hunte et al., 2010; Zickermann et al., 2015).

En los últimos años, se ha producido un considerable avance hacia el entendimiento de la relación estructura/función del Complejo I. A grandes rasgos, el Complejo I tiene forma de “L” con un brazo hidrofóbico embebido en la MIM y un brazo hidrofílico periférico que se extiende hacia la matriz mitocondrial (Figura 7). Por su función se pueden diferenciar cuatro módulos: el módulo de oxidación del NADH, el módulo de reducción de la CoQ (ambos localizados en el brazo periférico) y dos módulos bombeadores de protones que forman el brazo de membrana, denominados como

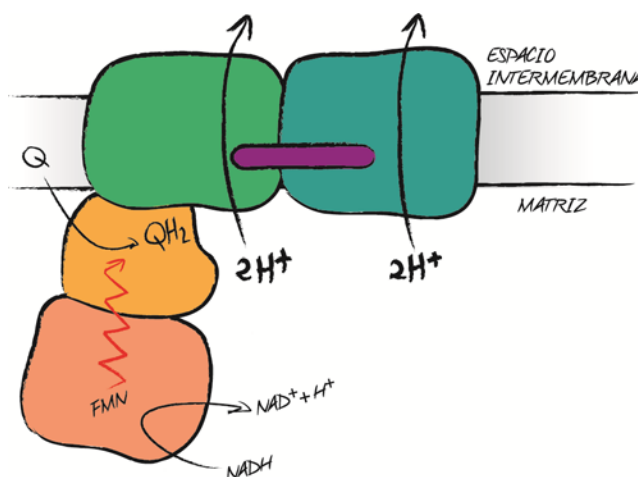


Figura 7: Estructura simplificada del Complejo I. Se representan los 4 módulos funcionales, 2 módulos en el brazo de membrana (proximal en verde y distal en azul) con capacidad de bombear protones y dos módulos en el brazo periférico, (oxidación del NADH en rojo y reducción de la CoQ en naranja).

proximal o distal en función de su distancia al brazo periférico. La energía necesaria para el bombeo de protones es generada por las reacciones redox que ocurren en los módulos del brazo periférico (El cofactor FMN acepta los electrones del NADH y los pasa a través de una cadena de siete centros Hierro-Azufre hasta el sitio de reducción de la CoQ) y es transmitida a los dos módulos bombeadores de protones en el brazo de membrana, los cuales están conectados por un elemento de transmisión helicoidal (Brandt, 2011; Dröse et al., 2011; Efremov et al., 2010; Hunte et al., 2010).

El ensamblaje de los complejos de la CTE en la membrana interna mitocondrial es un proceso complejo en el que se necesita de la participación de diversas proteínas. Estas proteínas, conocidas como factores de ensamblaje, no forman parte de la estructura final del complejo pero son necesarias para la correcta formación del mismo. En el caso del Complejo I, actualmente se acepta que está compuesto por 44 subunidades estructurales y al menos 12 factores de ensamblaje, aunque sigue siendo un tema de intenso debate con modificaciones constantes al número e importancia en la estructura final (Andrews et al., 2013; Balsa et al., 2012; Formosa et al., 2015).

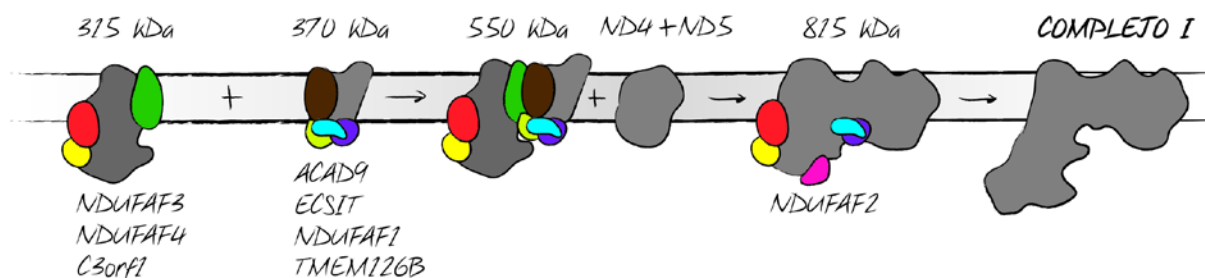


Figura 8: Esquema ensamblaje del Complejo I. El Complejo I se ensambla a través de un proceso secuencial, que requiere de numerosos factores de ensamblaje (en color) y de la correcta presencia de sus subunidades estructurales (en gris).

El Complejo I se ensambla a través de un complicado proceso secuencial (Ugalde et al., 2004) (Figura 8). En los modelos actuales el ensamblaje comienza con la formación de un subcomplejo de unos 315

kDa formado alrededor de las subunidades NDUFS2 y NDUFS3 y anclado a la membrana por ND1. Otras subunidades en este fragmento serían NDUFA5, NDUFS7 y NDUFS8. Las subunidades NDUFA3, NDUFA8 y NDUFA13 pueden ser ahora incorporadas gracias a la participación de 3 factores de ensamblaje: NDUFAF3, NDUFAF4 y C3orf1. Por otro lado, un subcomplejo de 370kDa formado por subunidades del brazo de membrana se ensambla conteniendo probablemente TMEM126B, ACAD9, ECSIT y NDUFAF1. Estos dos grandes subcomplejos se unen para dar lugar a un subcomplejo de 550kDa al que se le unen los componentes más distales del brazo de la membrana que incluyen ND4 y ND5. Esto da por terminado el dominio hidrofóbico embebido en la MIM de unos 815kDa, al que sólo le faltaría la región de la enzima que oxida el NADH. El último paso es la incorporación de la región distal del brazo periférico que incluye las subunidades NDUFA12, NDUFS1, NDUFS4, NDUFS6, NDUFV1, NDUFV2 y NDUFV3 gracias a la participación de NDUFAF2 (Andrews et al., 2013).

Cabe destacar que todas las subunidades proteicas del Complejo I codificadas por el ADNmt se encuentran en la región de membrana, lo que indicaría un papel clave como núcleo durante el ensamblaje. El proceso de ensamblaje del Complejo I no sólo es esencial para la estructura/funcionalidad de éste sino que también es vital para la formación de entidades de orden superior, los respirasomas (Moreno-Lastres et al., 2012).

1.3.3 Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno, son un grupo de moléculas derivadas del oxígeno que han aceptado electrones extra, pudiendo así oxidar a otras moléculas.

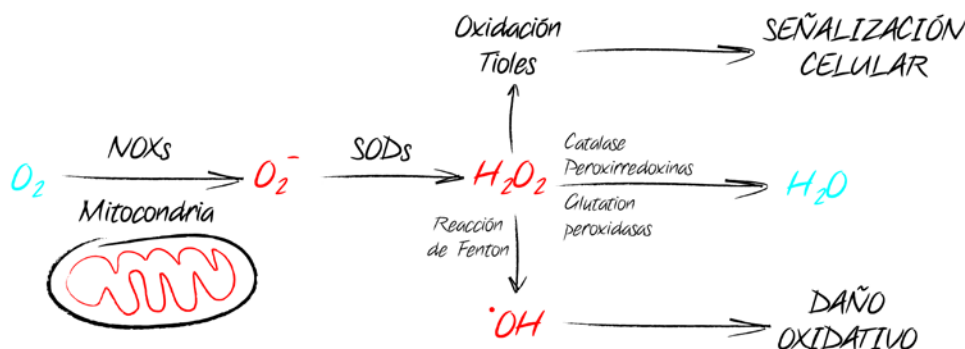


Figura 9: Radicales libres y sus destinos moleculares. Los radicales libres producidos tanto en la mitocondria como en el citoplasma, pueden o actuar en rutas de señalización, a través de la oxidación de grupos tiol de proteínas, detoxificarse mediante enzimas como Glutatión Peroxidasa (GPXs), Peroxirredoxinas (PRXs) o Catalasa a H₂O o bien producir daño oxidativo a diferentes componentes celulares.

La mayoría de los ROS se producen por la reducción del O₂ formando el anión superóxido O₂⁻. Dos moléculas de superóxido pueden entonces ser convertidas a una molécula de peróxido de hidrógeno H₂O₂ por las diferentes isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno a su vez puede aceptar otro electrón a través de la reacción de Fenton para dar lugar al radical hidroxilo (OH[•]) o bien puede ser reducido a H₂O por diversas enzimas como Glutatión Peroxidasa, Peroxirredoxinas o Catalasas (Figura 9).

El H_2O_2 tiene la capacidad de atravesar membranas y es significativamente más estable que el resto de ROS, lo que le permite actuar como segundo mensajero a través de la oxidación de residuos de cisteína. Los residuos de cisteína existen en un equilibrio entre su forma reducida Tiol (Cys-SH) y su forma oxidada Tiolato (Cys-S^-), pudiendo esta última reaccionar con el H_2O_2 para dar lugar a un residuo (Cys-SOH). Este cambio en los residuos de cisteínas puede directamente afectar el centro catalítico o bien de forma indirecta a través de residuos regulatorios modificar la actividad de la proteína o su capacidad de interaccionar con otras.

Esto hace de los ROS importantes moléculas señalizadoras a múltiples niveles, regulando proteínas clave de numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos, como GAPDH (Peralta et al., 2015), NOX1 (Desouki et al., 2005), ERK (Weinberg et al., 2010), NF- κ B (Morgan and Liu, 2011), AKT (Pelicano et al., 2006a; Sharma et al., 2011), HIF1 α (Majmundar et al., 2010) y SRC (Porporato et al., 2014) entre otras.

1.3.3.1 ROS Mitocondriales

La producción de anión superóxido O_2^- se atribuye principalmente a los complejos I y III (Bleier et al., 2015). El Complejo I liberaría todo el O_2^- producido en los centros hierro azufre del brazo periférico a la matriz mitocondrial, mientras que el Complejo III liberaría el superóxido producido a ambos lados de la membrana. Esta circunstancia le otorga un mecanismo potencialmente diferente en función de la fuente que los genere (Bleier et al., 2015; Muller et al., 2004).

Situaciones que alteran el transporte de electrones a través de los complejos de la CTE, como pueden ser inhibidores como Rotenona o Antimicina (Desouki et al., 2005), mutaciones en subunidades de los mismos (Kulawiec et al., 2009; Lenaz et al., 2004), presencia de elementos reguladores de su función como IF1 (Formentini et al., 2012a) o defectos en el ensamblaje de los complejos o supercomplejos (Gasparre et al., 2013; Maranzana et al., 2013) están asociadas con un aumento de la producción de ROS mitocondriales. Además, existen procesos fisiológicos que pueden regular la producción de ROS mitocondriales como la inducción de la subunidad NDUFA4L2 en hipoxia (Tello et al., 2011), la expresión de UCPs (Brand and Esteves, 2005; Mailloux and Harper, 2011) o los propios ROS modulando la transición entre las formas activa e inactiva del Complejo I (Babot et al., 2014; Dröse et al., 2014).

El aumento de la producción de ROS mitocondriales ha sido propuesto como mecanismo patológico en diferentes enfermedades mitocondriales y degenerativas (Cha et al., 2015; Kirkinezos and Moraes, 2001; Lenaz et al., 2004; Tuppen et al., 2010a), así como un elemento clave en el cáncer (Ishikawa et al., 2008; Martínez-Reyes and Cuezva, 2014; Sabharwal and Schumacker, 2014; Weinberg et al., 2010).

1.3.3.2 ROS citoplasmáticos

Más allá de la mitocondria, hay otras fuentes de ROS en la célula, entre las que destacan la familia de las NADPH oxidasas (NOX), que catalizan la producción de superóxido a partir de O_2 y $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Estas enzimas son homologas de gp91phox, proteína originalmente descrita en fagocitos en los que su función es la eliminación de patógenos fagocitados mediante estrés oxidativo. Desde su descubrimiento, se han descrito diferentes proteínas pertenecientes a la familia NOX con diversas funciones más allá de su implicación en el sistema inmune (Kamata, 2009).

1.3.4 Homeostasis del Calcio

La relación entre el calcio y las mitocondrias fue propuesta por Lehninger en los años 60, convirtiendo este orgánulo en el primer depósito de calcio intracelular descrito (Lehninger et al., 1963). No fue hasta unos años más tarde cuando se identificó al Retículo Endoplásmico (RE) como el principal depósito de Ca^{2+} en la célula. Actualmente, es aceptado que las mitocondrias apenas almacenan Ca^{2+} en condiciones basales, sin embargo, frente a determinados estímulos celulares las mitocondrias captan Ca^{2+} desde el citosol pudiendo alcanzar niveles de hasta 1 mM en la matriz mitocondrial. Cuando la estimulación cesa, liberan el Ca^{2+} acumulado para recuperar los niveles de reposo (de la Fuente et al., 2012).

La captación de Ca^{2+} mt ocurre gracias al Ψ_m generado a través de la MMI por el bombeo de H^+ de la cadena respiratoria y mediado por un canal iónico selectivo llamado MCU, (Mitochondrial Calcium Uniporter) (Bernardi, 1999; Kirichok et al., 2004). Debido a este sistema de captación, defectos mitocondriales que alteren el Ψ_m , pueden alterar la homeostasis del calcio celular (Brini et al., 1999; von Kleist-Retzow et al., 2007).

La acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria regula funciones intrínsecas en el orgánulo, entre ellas la actividad del Complejo V y varias enzimas del ciclo de Krebs (piruvato, α -cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasas). La estimulación de estas últimas aumenta la proporción de NADH y por tanto el flujo de electrones en la cadena respiratoria, ajustando la síntesis de ATP a las necesidades celulares (Griffiths and Rutter, 2009; Tarasov et al., 2012). Por otro lado, el incremento en la concentración de calcio mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$) favorece la liberación al citoplasma de factores mitocondriales, lo que desencadena la apoptosis (Patron et al., 2013; Rizzuto et al., 2012).

1.3.5 Procesos Biosintéticos

1.3.5.1 Fosfolípidos

La mitocondria contribuye al metabolismo celular de los fosfolípidos albergando la maquinaria que sintetiza al menos cuatro tipos diferentes: Acido Fosfatídico (PA), Fosfatidilglicerol (PG), Cardiolipina (CL) y Fosfatidiletanolamina (PE) (Lu and Claypool, 2015).

1.3.5.2 Pirimidinas

Una reacción clave en la síntesis de pirimidinas *de novo* es catalizada por la enzima mitocondrial dihidroorotato deshidrogenasa, cuya actividad requiere una cadena respiratoria funcional. Más específicamente, esta enzima cataliza la conversión de dihidroorotato a orotato, el cual es precursor de uridina monofosfato (UMP) siendo el aceptor de electrones para esta reacción redox en primera

producen fragmentación del DNA en el núcleo) o por pérdida de funciones mitocondriales vitales para la supervivencia celular (Potencial de membrana y ATP). La MOMP puede ser consecuencia de la generación de un poro por oligomerización de BAX/BAK o por la formación del PTP que hincha la matriz y rompe la membrana externa (Bonora et al., 2015; Correia et al., 2015; Tait and Green, 2010).

Canal BAX/BAK: Aunque el mecanismo todavía no está claro se cree que una vez activas debido a daño en el DNA o estrés en el RE, las proteínas BAX y BAK oligomerizan y forman un canal que produce la permeabilización de la membrana externa

El complejo PTP se forma en los puntos de contacto entre las dos membranas mitocondriales y está compuesto por numerosas proteínas como el propio Complejo V, VDAC, ANT, HK, CYPD, PiC, TSPO, CKMT1, GSK3 β y p53, así como varios miembros de la familia Bcl-2. La apertura del PTP, inducida principalmente por niveles altos de Ca²⁺ mitocondrial, produce la pérdida del $\Delta\Psi_m$ y un hinchamiento de la matriz, que en última instancia, rompe la membrana externa mitocondrial produciendo MOMP (Bonora and Pinton, 2014; Bonora et al., 2015).

Mecanismo en el citosol: Independientemente del origen de la señal, la liberación del citocromo C facilita la interacción de la proteína APAF-1 y la procaspasa 9, formando el “apoptosoma” donde se inicia una cascada de caspasas (iniciada con la activación de la procaspasa 3) que produce la proteólisis de cientos de sustratos que conducen al fenotipo apoptótico.

1.3.6.2 Vía Extrínseca (Receptores de membrana)

En la vía extrínseca, diferentes ligandos (TNF, TRAIL, APO3L, FASL) se unen a sus receptores (TNFR1, TRAILR1, TRAILR2, APO3, FAS) gracias a lo cual se recluta FADD (Fas-Associated Death Domain protein) y las pro-caspasas 8 y 10 que resultan activadas. La caspasa 8 activa a la caspasa 3, que ejecuta la vía intrínseca. La caspasa 8 también puede transferir la señal apoptótica a la mitocondria a través de la proteína BID, uniendo de esta forma la vía extrínseca con la vía mitocondrial.

1.3.7 Mitocondria como centro señalizador

Como se ha ido desprendiendo de los apartados anteriores, la importancia de la mitocondria va más allá de sus múltiples funciones individuales. La mitocondria tiene la capacidad de iniciar, integrar y comunicar señales a nivel celular, modificando el destino de la célula a múltiples niveles.

En los últimos años, con una visión más global del papel de la mitocondria en la biología celular, se ha acuñado el término Señal Retrograda Mitocondrial (Butow and Avadhani, 2004). Este concepto podría definirse como el conjunto de rutas de señalización originadas desde la mitocondria hacia el citoplasma o núcleo con capacidad de reprogramar la función celular. La mitocondria puede ejercer estas señales a través de diferentes elementos entre los que se incluyen: iones (Biswas et al., 1999), ROS (Formentini et al., 2012b), metabolitos o proteínas (Bénit et al., 2014; Monaghan and Whitmarsh, 2015; Weinert et al., 2013). En cualquier caso, muchos de estos mecanismos son aún desconocidos, siendo ésta un área de grandes avances en los últimos años.

1.4 PATOLOGIA MITOCONDRIAL

A pesar de las múltiples funciones que realiza la mitocondria, el uso del término enfermedad mitocondrial se restringe actualmente a aquellas enfermedades donde está afectada la función OXPHOS de forma directa o indirecta. No se consideran enfermedades mitocondriales, a pesar de que afectan a procesos mitocondriales, todas aquellas en las que se alteran rutas metabólicas que no afecten a la función OXPHOS.

Las enfermedades mitocondriales se caracterizan por una amplia variedad de síntomas, pudiendo además afectar a diferentes órganos y tejidos (mayoritariamente en tejidos con alta demanda energética). La presentación clínica es muy variable e incluye desde fenotipos severos como MELAS (Miopatía con Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares), MERRF (Epilepsia Mioclónica y Fibras Rojas Rasgadas), NARP (Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa) o MILS (Síndrome de Leigh heredado por vía materna) a otros fenotipos más leves como LHON (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber), Diabetes mellitus o Sordera neurosensorial. Debido al control genético dual del sistema OXPHOS, las enfermedades mitocondriales pueden estar causadas por mutaciones en el ADN nuclear o en el ADNmt.

1.4.1 ADN nuclear

El proteoma mitocondrial está formado por aproximadamente unas 2000 proteínas. Mutaciones en alguna de ellas pueden afectar a la función OXPHOS y producir patologías mitocondriales (Ylikallio and Suomalainen, 2012). A grandes rasgos estas mutaciones pueden afectar a:

Subunidades de los complejos OXPHOS: Se han descrito mutaciones en subunidades codificadas en el núcleo para los 5 complejos OXPHOS.

- **Complejo I:** NDUFS1, 2, 4, 7 y 8, NDUFV1 y NDUFA2 y 10 (Hoefs et al., 2008, 2011; Tuppen et al., 2010b).
- **Complejo II:** SDHA, B, C y D (King et al., 2006; Renkema et al., 2015).
- **Complejo III:** UQCRB, UQCRCQ (Barel et al., 2008; Haut et al., 2003).
- **Complejo IV:** COX6B1 (Abdulhag et al., 2014; Massa et al., 2008).
- **Complejo V:** ATP5A1, ATP5E (Hejzlarová and Mráček, 2014).

Por otro lado, aunque no son estrictamente subunidades de los complejos, mutaciones en la proteína Citocromo C producen una disminución de la función OXPHOS y una alteración del proceso de apoptosis (De Rocco et al., 2013), así como defectos en la síntesis de cofactores claves para las reacciones de óxido-reducción, como los centros Hierro-azufre (Lill et al., 2012; Sheftel et al., 2010) o la propia CoQ (Emmanuele et al., 2012) pueden producir síndromes similares.

Proteínas accesorias a la función OXPHOS: necesarias para el correcto ensamblaje y función de los complejos de la CTE (Para una revisión del tema ver (Ghezzi and Zeviani, 2012)).

- **Complejo I:** FOXRED1(Formosa et al., 2015), C20ORF7, NUBPL, NDUFAF1, 2, 3, 4, C8ORF38, ACAD9.
- **Complejo II:** SDHAF1, SDHAF2.
- **Complejo III:** HCCS, TTC19, BCS1L.
- **Complejo IV:** C2orf64, SURF1, TACO1, LRPPRC, COX15, COX10, hCOA3(Clemente et al., 2013).
- **Complejo V:** TMEM70, ATPAF2 (Hejzlarová and Mráček, 2014)

Replicación del ADNmt: mutaciones en genes responsables de la replicación del ADNmt (Helicasa mitocondrial, *POLG* (Lodi et al., 2015; Stumpf et al., 2013)) o en el metabolismo de nucleótidos (*DGOUK*, *TK2*, *TP*, *ANT1* (Copeland, 2012; Copeland and Longley, 2014)) pueden causar enfermedades mitocondriales al generar deleciones, mutaciones puntuales o depleción del mtDNA.

Transcripción del ADNmt: mutaciones en genes responsables de la síntesis, procesado, modificación, estabilidad y degradación de ARN mitocondriales pueden causar defectos OXPHOS (Nicholls et al., 2013). Dentro de la categoría de proteínas modificadoras de ARN transferentes (Powell et al., 2015), se encuentran ARNt sintetasas como YARS2 (Riley et al., 2010), DARS2 (Scheper et al., 2007) y RARS2 (Edvardson et al., 2007) o la enzima modificadora de ARNt TRMU entre otras.

Traducción del ADNmt: requiere la implicación de distintas proteínas como son los factores de iniciación, elongación, liberación, proteínas ribosomales y proteínas implicadas en el reciclado ribosomal. Distintas mutaciones en estas proteínas se han asociado a enfermedades mitocondriales (Antonicka et al., 2010; Kemp et al., 2011).

Dinámica Mitocondrial: mutaciones en genes encargados de la dinámica mitocondrial, como pueden ser *OPA*, *MFN2*, *DRP1*, *PINK1*, *PARKIN* (Chen and Chan, 2009) pueden alterar los procesos de fusión, fisión, movilidad o recambio mitocondrial que pueden llegar a ser clave para una correcta función OXPHOS.

Transporte y control de calidad de proteínas mitocondriales: defectos en el transporte al interior mitocondrial de los péptidos o problemas en el plegamiento o control de calidad de proteínas mitocondriales pueden cursar con patología mitocondrial. Por ejemplo, mutaciones en el gen de la paraplejina, que codifica para una subunidad de la m-AAA proteasa en humanos, producen HSP (Hereditary spastic paraplegia). Fibroblastos de estos pacientes presentan niveles reducidos de ATP debido probablemente a un defecto en el Complejo I de la CTE (Koppen and Langer, 2007).

Metabolismo de fosfolípidos: mantener una adecuada composición lipídica de la MIM es necesaria tanto para mantener la funcionalidad de las proteínas embebidas en ésta como para mantener su función de barrera para la generación de un potencial electroquímico. Defectos en el porcentaje de cardiolipina como los producidos por mutaciones en *TAZ* pueden producir Síndrome de Barth con un fenotipo claramente de afectación OXPHOS (Lu and Claypool, 2015).

1.4.2 ADNmt

A diferencia de las mutaciones en el ADNn, todas las mutaciones en el ADNmt afectan de forma directa al sistema OXPHOS, ya sea a través de mutaciones en alguna de las 13 proteínas de los complejos, o en los ARNs de transferencia o ARN ribosómicos 12S y 16S. Incluso se han descrito mutaciones en la región DLOOP que podrían modificar el número de copias de ADN mitocondrial (Liou et al., 2010). En cualquier caso se pueden diferenciar entre deleciones y mutaciones puntuales.

Deleciones: Las deleciones pueden presentar una longitud variable y afectar a cualquier región del ADNmt. A pesar de ello, existe una zona de mayor predisposición para este fenómeno, conocida como “delección común” (Figura 11). La delección común presenta un tamaño de $\approx 5\text{Kb}$ y abarca la región comprendida entre los genes *MT-ND5* y *MT-ATP8*. Las deleciones de gran tamaño pueden causar prácticamente todos los síndromes de encefalopatías mitocondriales, aunque habitualmente se asocian a CPEO (Oftalmoplejia externa progresiva crónica), el síndrome de Kearns-Sayre y el síndrome de Pearson. En algunos pacientes aparecen duplicaciones del ADNmt que, aunque no son patogénicas por sí mismas, podrían ser un paso intermedio en la generación de deleciones (Damas et al., 2014; Schapira, 2006).

Mutaciones puntuales: Hasta la fecha, cerca de 300 mutaciones patogénicas han sido identificadas en el genoma mitocondrial, afectando ARNs ribosómicos, ARN de transferencia y proteínas. Las mutaciones en el ADNmt pueden causar síndromes multisistémicos (como es la mayoría de los casos de mutaciones en ARNt) o pueden afectar órganos específicos como es el caso del LHON (Greaves et al., 2012) (Figura 11). Mutaciones en genes codificantes para proteínas afectan a un único complejo OXPHOS. Sin embargo, mutaciones en ARNt alteran la maquinaria de traducción de las 13 proteínas mitocondriales, afectando así a 4 de los 5 complejos OXPHOS y dando lugar a defectos enzimáticos combinados (Bornstein et al., 2005).

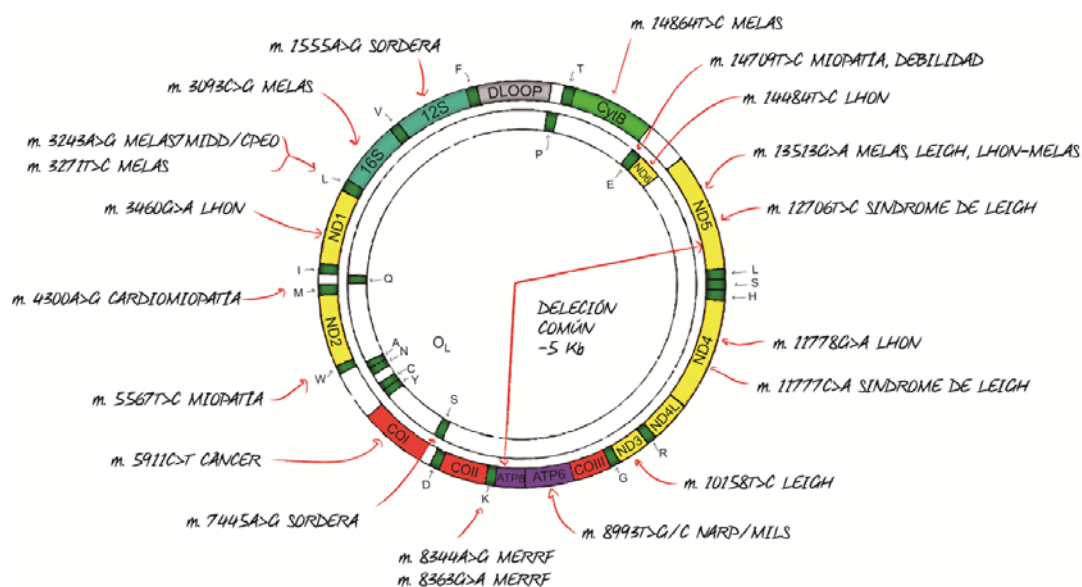


Figura 11: Relación entre Fenotipo y Genotipo para mutaciones del ADNmt. Se muestran algunas de las 300 mutaciones más importantes descritas en patología y la delección común de 5Kb.

1.4.3 Haplogrupos

Además de las variantes estrictamente patológicas, tanto nucleares como mitocondriales, que pueden causar una enfermedad mitocondrial, existen como se ha mencionado anteriormente un conjunto de polimorfismos en el ADNmt que definen los conocidos como haplogrupos mitocondriales. En los últimos años la asunción de que los haplogrupos mitocondriales son neutros se ha visto cuestionada, ya que estos se han asociado epidemiológicamente con diferentes enfermedades, como Alzheimer o Parkinson (Coskun et al., 2012), insuficiencia cardíaca (Gallardo et al., 2012), infertilidad (Ruiz-pesini et al., 2000), osteoartritis (Soto-Hermida et al., 2014) o cáncer (Wang et al., 2014), entre otras. Además, se han relacionado con una adaptación evolutiva a diferentes condiciones climáticas: los haplogrupos propios de regiones más frías, presentarían una CTE con mayor desacoplamiento, lo que favorecería la producción de calor frente a los haplogrupos dominantes en regiones tropicales que estarían especializados en la producción de ATP (Mishmar et al., 2002; Ruiz-Pesini et al., 2004).

La importancia de los haplogrupos ha sido demostrada mediante el uso de modelos celulares, sugiriendo un papel importante de los mismos en el rendimiento OXPHOS (Gómez-Durán et al., 2010) así como en el ensamblaje de sus componentes (Pello et al., 2008). Por lo tanto, los haplogrupos mitocondriales suponen un elemento modificador en las patologías mitocondriales, pudiendo ser un factor de riesgo o de protección (Kenney et al., 2014).

1.4.4 Cíbridos como sistema modelo

El sistema de híbridos citoplasmáticos, también conocido como cíbridos transmitocondriales o simplemente cíbridos, representa un modelo ampliamente utilizado para estudiar los efectos de diferentes variantes de ADNmt en la fisiología celular y la patología humana (Bornstein et al., 2005; Chomyn et al., 1994). Estas líneas celulares son generadas mediante la fusión de células carentes de ADNmt (células ρ^0) con citoplastos, clásicamente plaquetas o fibroblastos enucleados (King and Attardi, 1989).

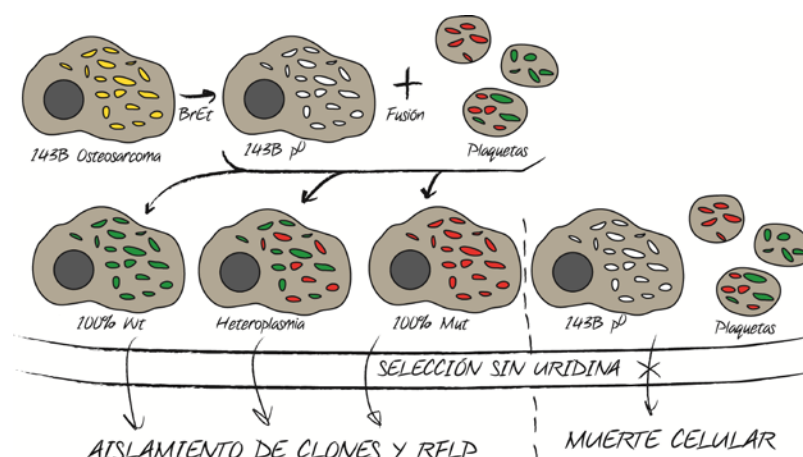


Figura 12: Esquema del proceso de Cíbridización. La línea parental es deplecionada mediante tratamiento con BrEt obteniéndose una línea que carece de ADNmt. La línea ρ^0 resultante puede fusionarse a plaquetas o células enucleadas para adquirir de forma permanente su ADNmt. Tras la fusión los cíbridos son seleccionados sin uridina y los clones son analizados. En amarillo: ADNmt parental, Blanco: Ausencia de ADNmt, Verde: ADNmt salvaje, Rojo: ADNmt portador de mutación.

Este sistema permite estudiar el efecto de determinadas variantes de ADNmt sin influencias del fondo nuclear. Además, en el caso de partir de pacientes que presentan la mutación en heteroplasmia es posible aislar clones con diferente carga mutacional, pudiendo obtener así cíbridos control y cíbridos

mutantes isogénicos, es decir, diferenciándose únicamente en el nucleótido objeto de estudio del ADNmt, evitando así posibles efectos modificadores del haplogrupo o de otros SNPs (Figura 12).

A pesar de las grandes ventajas que presentan los híbridos como sistema modelo a la hora de evaluar la función de una variante de ADNmt, muestran unas limitaciones que hay que tener en cuenta a la hora de sacar conclusiones firmes.

La mayoría de estos modelos se realizan sobre líneas tumorales, que muy frecuentemente son líneas celulares aneuploides y presentan una alta inestabilidad genómica, lo que habitualmente conduce a una alta heterogeneidad celular, incluso dentro del mismo cultivo (Hao et al., 1999). Un ejemplo paradigmático es la ampliamente utilizada línea celular Hela, donde el número modal de cromosomas es 82, con un rango entre 70 y 164. Por lo tanto, para evitar o reducir cualquier tipo de efecto clonal se deben analizar al menos 2 clones independientes para cada línea analizada (Chomyn et al., 1994).

1.4.5 Fenotipo mitocondrial severo- Mutaciones en ARNt - MERRF

Aunque el papel del ARNt en la traducción se conocía desde finales de los años 50 y el primer caso descrito de MERRF se describió en 1980 (Fukuhara et al., 1980), no fue hasta el comienzo de los años 90 cuando se asociaron mutaciones puntuales en ARNt con patología. Así fue para el síndrome MELAS (MIM 540000), relacionado con una mutación en el gen que codifica para el ARNt^{Leu} (Kobayashi et al., 1990) y la enfermedad MERRF (MIM 545000) con una mutación en el ARNt^{Lys} (Shoffner et al., 1990). Desde entonces, numerosas mutaciones en ARNs de transferencia han sido asociadas con múltiples enfermedades, así como determinadas enfermedades han sido relacionadas con mutaciones en diferentes ARNt (Abbott et al., 2014).

La mutación m.8344A>G es responsable de la mayoría de los casos de MERRF (Shoffner and Wallace, 1992) aunque existen otras mutaciones como m.8356T>C o m.8363G>A responsables de esta enfermedad. El cuadro clínico de esta grave patología suele comenzar durante la infancia o la adolescencia y aunque exista variabilidad en la expresión de su sintomatología (incluso dentro de una misma familia de afectados) cursa principalmente con mioclonías y epilepsia, presentándose además de forma habitual problemas mentales, atrofia muscular, acidosis láctica y las características fibras musculares rojo-rasgadas en el diagnóstico.

El pronóstico para los pacientes con síndrome MERRF es muy desfavorable debido a la naturaleza progresiva de la enfermedad. Dentro de la variabilidad, aquellos con síntomas de presentación no cerebral pueden tener una supervivencia prolongada con un menor número de discapacidades.

A nivel molecular, estas mutaciones con niveles altos de heteroplasmia producen un defecto severo en la síntesis de las 13 proteínas mitocondriales, con la consecuente pérdida en la cantidad y actividad de todos los complejos OXPHOS (a excepción del Complejo II que no contiene subunidades codificadas en el ADNmt) (Abbott et al., 2014; Chomyn et al., 1991).

1.4.6 Fenotipo mitocondrial leve- Mutaciones en proteínas - LHON

Un ejemplo paradigmático de enfermedad leve mitocondrial y específica de tejido es la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON; MIM 535000), denominada así en honor del oftalmólogo que la describió por primera vez en 1871 (Leber, 1871; Piotrowska et al., 2015). Esta enfermedad, produce la degeneración de las células ganglionares de la retina, que conduce a la atrofia del nervio óptico y a la pérdida de visión central. Fue la primera patología humana asociada con una mutación puntual en el ADNmt (Wallace et al., 1988).

Actualmente, está considerada como la patología mitocondrial más común para la que se han descrito cerca de 30 mutaciones responsables con una prevalencia muy variable, ya que tan solo 3 de estas 30 concentran el 95% de los casos (MITOMAP). Estas mutaciones, m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C, conocidas como mutaciones primarias de LHON, afectan a los genes *MT-ND1*, *MT-ND4* y *MT-ND6*, todos codificantes de subunidades del Complejo I (Kirches, 2011; Yu-Wai-Man et al., 2009).

En cualquier caso, esta patología presenta una penetrancia incompleta y habitualmente un desarrollo de los síntomas tardío, lo que implica que las manifestaciones fenotípicas pueden involucrar otros factores como el fondo nuclear y mitocondrial (haplogrupos), factores ambientales y el propio envejecimiento, que causa una pérdida progresiva en la función mitocondrial (Kirches, 2011; Riordan-Eva and Harding, 1995; Wallace, 1999).

En la mayoría de los pacientes de LHON y sus familiares la mutación patogénica se encuentra en homoplasmia o cercana a ésta en sangre, aunque situaciones de heteroplasmia también han sido descritas (Smith, 1993). El riesgo de desarrollar síntomas correlaciona positivamente con los niveles de heteroplasmia, aumentando cuando estos alcanzan un 80% de copias mutadas.

Un gran número de estudios han investigado los defectos bioquímicos y moleculares asociados con las mutaciones primarias LHON. Debido a que estas mutaciones afectan al Complejo I, sería esperable una caída en su actividad, con la consecuente disfunción en la CTE y en la síntesis de ATP. A pesar de ello, existe en la literatura una considerable variabilidad debido al uso de diferentes metodologías, tipos celulares analizados y a la falta de controles apropiados, consecuencia de la gran variabilidad que se encuentra entre la población sana (Man et al., 2002). Además, es posible que las consecuencias directas de una caída en la actividad del Complejo I, como la reducción de la síntesis de ATP mitocondrial no sean responsables de la patología, y este efecto se ejerza de forma indirecta a través de mecanismos señalizadores desde la mitocondria.

1.5 MITOCONDRIA Y CANCER

El cáncer es una enfermedad compleja desencadenada por una variedad de factores entre los que se incluyen mutaciones en protooncogenes y en genes supresores de tumores. Como consecuencia de estos cambios, las células cancerosas desregulan su ciclo celular, reducen su capacidad de entrar en apoptosis e incrementan su tasa de proliferación lo que conduce a una acumulación de masa celular que compromete la función del tejido (Hanahan and Weinberg, 2011).

El descubrimiento de mitocondrias alteradas en tejidos tumorales estimuló el estudio de la relación entre la mitocondria y el cáncer (Hoberman, 1975; Pedersen et al., 1970; Warburg et al., 1927). De acuerdo a esto, se han encontrado mutaciones en genes nucleares que codifican enzimas del ciclo de Krebs en paragangliomas hereditarios, feocromocitomas, leucemia mieloide aguda y glioblastomas entre otros (Gaude and Frezza, 2014; King et al., 2006; Mardis et al., 2009; Parsons et al., 2008). Además, se han encontrado mutaciones en el ADNmt en numerosos casos, sin un papel claro de estas en el proceso de transformación neoplásica (Chatterjee et al., 2006; Ju et al., 2014; Larman et al., 2012).

1.5.1 Efecto Warburg

A diferencia de las células diferenciadas, que en presencia de oxígeno se apoyan en un metabolismo oxidativo, las células tumorales presentan la capacidad de reprogramar su metabolismo para mantener un metabolismo altamente glucolítico aún en presencia de oxígeno. Este fenómeno de glucolisis aerobia característica de los tejidos tumorales, descrito a comienzos del siglo XX, se conoce como “efecto Warburg” (Vander Heiden et al., 2009; Warburg et al., 1927; Ward and Thompson, 2012) (Figura 13). Además, la fosforilación oxidativa está reducida en la mayoría de las células tumorales, siendo la combinación de una alta glucolisis y una función OXPHOS reducida (huella bioenergética o metabotipo) utilizada como marcador tumoral (Formentini et al., 2010).

Es más, uno de los sistemas más importantes para el diagnóstico del cáncer, la tomografía por emisión de positrones con el radiofármaco 18-Fluorodesoxyglucosa (FDG-PET) se basa en este efecto diferencial de las células tumorales, que las fuerza a consumir más glucosa que los tejidos circundantes (Wahl et al., 1991).

La glucolisis aeróbica es una forma ineficiente de obtener energía comparada con la fosforilación

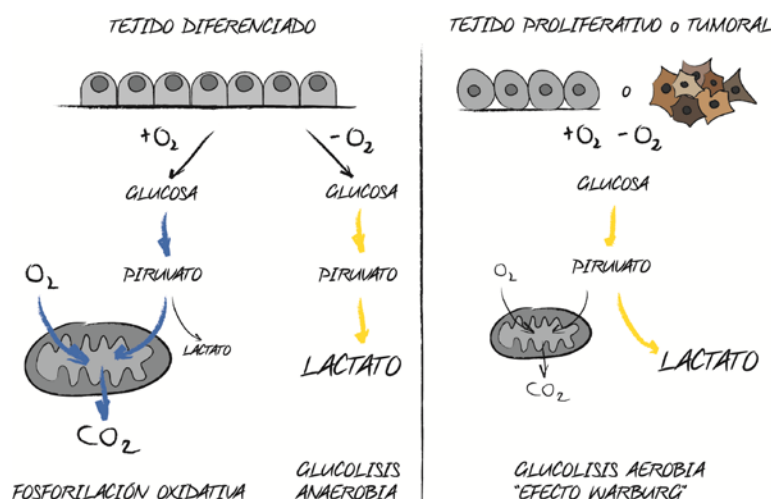


Figura 13: Efecto Warburg. Los tejidos diferenciados responden a la disponibilidad de oxígeno, cambiando entre un metabolismo oxidativo o de glucolisis anaerobia, por el contrario los tejidos tumorales o proliferativos se basan en un metabolismo glucolítico independientemente del oxígeno disponible (Glucolisis aeróbica o efecto Warburg).

oxidativa (2 mol ATP/ mol Glucosa vs. 36 mol ATP/ mol Glucosa). Las primeras teorías defendían que esta utilización ineficaz de la glucosa se debía a una mitocondria dañada o no funcional. Actualmente se cree que existe un proceso de reprogramación metabólica de las células tumorales en las que se seleccionaría éste metabolismo de una forma activa, incluyéndose el efecto Warburg y la reprogramación metabólica como una de las señas de identidad del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011). Apoyando esta teoría se ha demostrado que la activación de oncogenes como *RAS* (Weinberg et al., 2010), *MYC* (Li et al., 2005), *HIF* (Majmundar et al., 2010) o la inactivación de genes supresores de tumores como *TP53* (Zaug et al., 2011) favorecen este tipo de metabolismo.

La glucólisis aerobia le proporcionaría un flujo metabólico incrementado del que derivar intermediarios utilizados en procesos anabólicos, situación clave en células con una alta tasa de proliferación como las tumorales (ver 1.3.1, Figura 5)

1.5.2 ADNmt y Cáncer

La reciente secuenciación masiva realizada en miles de muestras de tejido tumoral y su correspondiente control sano, por el consorcio “The Cancer Genome Atlas (TCGA)” ha identificado numerosas mutaciones en el ADNmt de las células tumorales. Esto sugiere que las variantes del ADNmt podrían conducir a alteraciones metabólicas que serían importantes en la transformación maligna, aunque la relevancia patológica de estas observaciones permanece oculta (Chatterjee et al., 2006; Ju et al., 2014; Larman et al., 2012). Para el estudio de la importancia de estas mutaciones el modelo de cíbridos transmitocondriales se revela como una herramienta clave (Kaiparettu et al., 2010).

Los primeros estudios relacionando variantes del ADNmt y cáncer se realizaron incluso antes del desarrollo de las células ρ^0 , siendo por lo tanto previos a la actual tecnología de cíbridos. En estos estudios, la capacidad tumorigénica de una línea celular era modificada alterando su contenido citoplasmático (Hayashi et al., 1986; Howell and Sager, 1978). Posteriormente, la tecnología de cíbridos ha sido utilizada para examinar la relación entre ADNmt y tumorigenicidad en diferentes líneas celulares y para una variedad de mutaciones en el ADNmt (Hayashi et al., 1992; Ishikawa et al., 2008; Petros et al., 2005; Shidara et al., 2005). El rol de las mutaciones del ADNmt en la tumorigenesis es aún controvertido, probablemente debido a que en la mayoría de los casos se estudió una única mutación, en un único control, y con un solo un clon analizado para cada condición.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Las enfermedades relacionadas con la función OXPHOS se presentan con una elevada complejidad y variabilidad, lo que hace difícil entender su mecanismo patofisiológico. En muchos casos, el camino genotipo-fenotipo permanece oculto, especialmente para patologías con fenotipos moderados como LHON, así como para su posible relación con el cáncer. Utilizando el sistema controlado de cíbridos podremos desvelar alguno de estos mecanismos y su relación con la patología.

Objetivo general:

- Estudiar la relación entre ADN mitocondrial y la patología humana gracias a la tecnología de cíbridos transmitocondriales, que permite el estudio de estas mutaciones independizándolas del efecto del fondo nuclear.

Objetivos específicos:

- Generar una librería de cíbridos transmitocondriales en la que estén representadas las mutaciones primarias que cubren el 95% de los casos de LHON (m.3460G>A, m.11778G>A, m.14484T>C) así como las líneas de cíbridos control (aquellas correspondientes a los haplogrupos de las moléculas de mtDNA portadoras de la mutaciones).
- Realizar un estudio bioquímico-molecular en profundidad que pueda explicar la compleja patofisiología de estas mutaciones.
- Utilizando esta librería de cíbridos realizada sobre la línea tumoral 143B, estudiar la relación entre ADN mitocondrial y cáncer.
- Analizar la reprogramación metabólica en una serie de líneas celulares ya establecidas con diferentes capacidades tumorigénicas.

-

3. MATERIALES, METODOS y RESULTADOS

3.1 CAPITULO 1

Functional characterization of three concomitant mtDNA LHON mutations shows no synergistic effect on mitochondrial function

Alberto Cruz-Bermúdez, Ramiro J. Vicente-Blanco, Rosana Hernández-Sierra, Mayte Montero, Javier Alvarez, Mar González Manrique, Alberto Blázquez, Miguel Angel Martín, Carmen Ayuso, Rafael Garesse and Miguel A. Fernández-Moreno.

Resumen capítulo 1:

La neuropatía óptica hereditaria de Leber es una forma de degeneración de las células ganglionares de la retina que conduce a la atrofia del nervio óptico y a la pérdida de visión central. Esta enfermedad presenta una prevalencia aproximada de 1 cada 25.000 individuos, siendo la concurrencia de dos mutaciones primarias causantes de LHON en un mismo individuo un evento excepcional.

En este trabajo se realizó un amplio estudio de la función mitocondrial en cíbridos derivados de un paciente que presenta las mutaciones primarias LHON m.11778G>A y m.14484T>C, así como una tercera mutación asociada con LHON m.11253T>C (TRIPLE). Para evaluar si estas mutaciones estaban ejerciendo un efecto sinérgico en el defecto de la función mitocondrial se analizaron de igual manera cíbridos portadores de las mutaciones m.11778G>A (ND4) y m.14484T>C (ND6) presentes de manera individual, lamentablemente no se pudo obtener muestra para el estudio de la mutación m.11253T>C aislada. Todos los estudios se normalizaron con controles pertenecientes al haplogrupo más cercano posible, centrándonos únicamente en el papel de las mutaciones del estudio. Además, para obtener una mayor fiabilidad se analizaron al menos dos clones independientes por cada línea utilizada.

Los parámetros de función mitocondrial mostraron una afectación moderada para los cíbridos portadores de las mutaciones LHON en estudio, sin diferencias significativas entre la presencia en estos de una o más mutaciones en la misma molécula de ADNmt. No se observaron diferencias significativas para ninguno de los siguientes parámetros: capacidad de crecimiento en galactosa, ATP mitocondrial, consumo de oxígeno, polarización de la membrana interna mitocondrial o producción de lactato. Profundizando un poco y centrándonos en las consecuencias de estas mutaciones en el Complejo I, en concordancia con nuestros resultados anteriores, tampoco se observó un defecto mayor en la actividad enzimática del mismo. Además, los cíbridos potencialmente más afectados, portadores de las tres mutaciones, no presentaron defectos ni en la actividad de otros complejos ni en los niveles de Complejo I o en su proceso de ensamblaje. Finalmente, los niveles de anión superóxido mitocondrial tampoco resultaron diferentes.

En conclusión, en este trabajo se demuestra que la concurrencia de las 3 mutaciones en las subunidades ND4 y ND6 del Complejo I no producen un defecto sumatorio comparadas con la presencia de las mutaciones m.11778G>A y m.14484T>C de forma individual. Sugiriendo un mecanismo de acción similar para la afectación del Complejo I. Estos resultados están apoyados además por el fenotipo del paciente portador de las 3 mutaciones, el cual presenta un desarrollo LHON clásico.

El doctorando realizó las líneas celulares de cíbridos, la caracterización bioquímica y molecular (medidas de ATP, consumo de oxígeno, producción de lactato, medidas por citometría de flujo del potencial mitocondrial y de los niveles de superóxido mitocondrial), así como los estudios de ensamblaje del Complejo I. Además, participó en la creación de las figuras y escritura del artículo científico.

Functional characterization of three concomitant mtDNA LHON mutations shows no synergistic effect on mitochondrial activity

Alberto Cruz-Bermúdez^{1,2,a}, Ramiro J. Vicente-Blanco^{1,2}, Rosana Hernández-Sierra^{1,2}, Mayte Montero³, Javier Alvarez³, Mar González Manrique⁴, Alberto Blázquez², Miguel Angel Martín², Carmen Ayuso⁵, Rafael Garesse^{1,2,*} and Miguel A. Fernández-Moreno^{1,2,*}.

1- Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC and Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER). Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain.

2- Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12). Madrid, Spain and Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER).

3- Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid. Valladolid, SPAIN.

4.- Hospital de Móstoles, Universidad Rey Juan Carlos. 28935 Madrid, Spain.

5.- Department of Genetics, IIS-Fundacion Jimenez Diaz University Hospital (IIS-FJD, UAM). Madrid, Spain and Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER).

a.- Present address: Servicio de Oncología Médica, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro (IDIPHIM), Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Calle Manuel de Falla, 1. Madrid 28222, Spain.

* To whom correspondence should be addressed at: Miguel A. Fernandez-Moreno. Phone +34-91-4973129. Fax: +34-91-5854401. Email: miguel.fernandez@uam.es. Rafael Garesse. Phone:+34-91-4975452. Fax:+34-91-5854401. Email: rafael.garesse@uam.es

Abstract

The presence of more than one non-severe pathogenic mutation in the same mitochondrial DNA (mtDNA) molecule is very rare. Moreover, it is unclear whether their co-occurrence results in an additive impact on mitochondrial function relative to single mutation effects. Here we describe the first example of a mtDNA molecule harboring three Leber’s hereditary optic neuropathy (LHON)-associated mutations (m.11778G>A, m.14484T>C, m.11253T>C) and the analysis of its genetic, biochemical and molecular characterization in transmitochondrial cells (cybrids). Extensive characterization of cybrid cell lines harboring either the 3 mutations or the single classic m.11778G>A and m.14484T>C mutations revealed no differences in mitochondrial function, demonstrating the absence of a synergistic effect in this model system. These molecular results are in agreement with the ophthalmological characteristics found in the triple mutant patient, which were similar to those carrying single mtDNA LHON mutations.

KEYWORDS: Mitochondrial pathology, mtDNA mutations, LHON, Cybrids, synergy.

Introduction

Mitochondrial complex I is the largest and least understood component of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system. It is the entry point for electrons into the respiratory chain and couples the transfer of electrons from NADH+H⁺ to CoQ with proton pumping across the mitochondrial intermembrane space. Complex I produces approximately 40% of the

proton-motive force and is considered the major mitochondrial source of reactive oxygen species (ROS) [1].

Considerable progress has been made in recent years towards understanding the structure and function of complex I. Complex I has a characteristic L-shape structure with a hydrophobic arm embedded in the mitochondrial

inner membrane and a peripheral hydrophilic arm that protrudes into the mitochondrial matrix. It can be organized in four modules according to their function: the NADH-oxidation and the quinone-reduction modules localized in the peripheral arm, and two proton-pumping modules forming the membrane arm, which are designated as proximal and distal according to the distance to the peripheral arm. The energy necessary for proton pumping is generated by the redox reactions occurring in the modules of the peripheral arm, where the flavin mononucleotide (FMN) cofactor accepts electrons from $\text{NADH} + \text{H}^+$ and passes them to the CoQ reduction site, in a flow whereby electrons lose part of their energy that is used by the proton-pumping modules [2,3,4,5].

Human complex I consists of 45 subunits, of which 7 are encoded in the mitochondrial DNA (mtDNA) and the remaining 38 are encoded by the nuclear genome and later imported into mitochondria. All complex I mtDNA-encoded proteins are highly hydrophobic and are members of the proton pumping modules [6]. Mutations in any of the 45 subunits, or in the factors that assemble them, are candidates for complex I deficiencies (phenotype MIM #252010), the most common group of OXPHOS disorders in humans [7]. Mutations in mtDNA produce a remarkable spectrum of associated phenotypes, from weak single disease to devastating syndromes, due to the intrinsic nature of mitochondrial genetics and the specific energy requirements of the different cell types affected [8]. The most common mtDNA-associated complex I disease is Leber's hereditary optic neuropathy (LHON; MIM #535000).

LHON is a maternally-inherited form of retinal ganglion cell degeneration that leads to optic atrophy and loss of central vision. LHON was the first human pathology to be associated with a mtDNA point mutation [9]. Currently, three mtDNA point mutations, the so-called three primary or common LHON mutations, affecting subunits of complex I, are described to be responsible for 95% of LHON cases: m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C [10]. Although literature on complex I deficiency and mitochondrial dysfunction induced by these primary mutations is extensive, the data is also somewhat contentious, particularly regarding the severity of such alterations. This could be in part due to the comparison of different parameters (such as mitochondrial ATP synthesis or oxygen consumption), biological sources (such as muscle biopsies, lymphoblasts, fibroblasts or hybrids, among others), and techniques utilized (such as spectrophotometry for in vitro respiratory chain complex activity and in vivo respiration, or phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P-MRS)) [11].

In addition to the three primary mutations, approximately 30 different point mutations have been associated with LHON and are classified into two groups; the "top-14", which include the three primary mutations, and a group of single family or singleton cases, such as the m.11253T>C mutation described in this study.

LHON has an incomplete penetrance and commonly presents a delayed onset, which implies that the phenotypic expression may involve other factors in addition to the known mutations, such as the nuclear and mitochondrial

genetic background, environmental and age-related factors [12,13,14].

The presence of three concomitant pathogenic mutations in a single mtDNA molecule has not been described in the literature, and therefore comparisons with similar situations are challenging. However, the presence of two non-severe mtDNA mutations in the same molecule, although also very rare, has been described in a few LHON cases. Accordingly, the co-occurrence of two of the three primary LHON mutations has been detected in five families (Table 1, row A) [15,16,17,18]. Furthermore, four studies have described the concomitant

presence of one of the three common LHON mutations together with one of the remaining “top-14” LHON mutations (Table 1, row B) [19,20,21,22]. Finally, there are several cases of LHON patients (examples are shown in Table 1 row C) simultaneously harboring one of the three primary LHON mutations and a non-LHON related mtDNA mutation, including m.1555A>G, associated with aminoglycoside-induced non-syndromic hearing loss [23,24], a common deletion related to progressive external ophthalmoplegia (PEO) and Kearns–Sayre syndrome (KSS) [25], or m.12192G>A, associated with cardiomyopathy [26].

	Mutations ^a			Heteroplasmy (%)	Synergy	Evidence	Functional studies	Reference
A	m.11778G>A	m.3460G>A	-	100 / 10	Suggested	clinical	No	[17]
	m.11778G>A	m.14484T>C	-	(23-77) ^b / 100	No	clinical	No	[16]
	m.11778G>A	m.14484T>C	-	(94/31) ^c / 100	Yes	biochemical	Yes ^d	[15]
	m.11778G>A	m.14484T>C	-	100/ (70/30) ^e	ND ^e	ND	No	[12]
B	m.11778G>A	m.14502T>C	-	ND	Suggested	clinical	No	[22]
	m.11778G>A	m.14502T>C	-	100 / 100	Suggested	ND	No	[21]
	m.11778G>A	m.14502T>C	-	100 / 100	Suggested	clinical	No	[19]
	m.11778G>A	m.14484T>C	-	(100 / 100)	Suggested	clinical	No	[20]
C	m.11778G>A	m.1555A>G	-	100 / 100	Suggested ^f	clinical	No	[24]
	m.14484T>C	m.1555A>G	-	100 / 100	Suggested ^f	clinical	No	[23]
	m.11778G>A	common deletion	-	100 / (0-62) ^g	NO	clinical	No	[25]
	m.11778G>A	m.12192G>A	-	100 / 100	Suggested ^f	clinical	No	[26]
D	m.11778G>A	m.14484T>C	m.11253T>C	100/100/100	NO	biochemical	Yes	This work

Table 1. Synergistic effect of concomitant mtDNA mutations with at least one LHON-associated mutation. All mutations and their classifications are described in MITOMAP [10].

- In all rows, the first mutation belongs to the three primary LHON mutations (>95% of LHON cases). Row A, the second mutation also belongs to the three primary LHON mutations. Row B, the second mutation belongs to the remaining “top-14” primary LHON mutations. Row C, some of the cases in which the second mtDNA mutation is not described to be associated with LHON but instead to other mitochondrial diseases, such as aminoglycoside-induced non-syndromic hearing loss (m.1555A>G), progressive external ophthalmoplegia (PEO) and Kearns–Sayre syndrome (KSS) (≈ 5kb common deletion) and cardiomyopathy (m.12192G>A). Row D, the triple LHON mutation described in this study; two mutations belong to the three primary LHON mutations and the third is associated with LHON in a single family (see text).
- Range in two families analyzed.
- Proband/asymptomatic mother of the proband
- Complex I dependent respiration and complex I *in vitro* activity
- ND: no data or authors do not comment.
- Affecting only LHON, not hearing loss, phenotype. Proband did not present hearing loss symptoms
- Common deletion is absent in mtDNA from blood, 58% in orbicularis oculi muscle and 62% in quadriceps femoris muscle

As shown in Table 1, 7 out of 9 of these studies suggest a possible synergistic effect of the mutations strictly based on the clinical penetrance and a possible involvement of the nuclear background. The two remaining studies suggest that there are no synergistic effects between LHON mutations, based only on clinical observations. None of the studies carried out a complete biochemical analysis and only one [15] performed biochemical assays to measure complex I-linked respiration and *in vitro* activity. Nevertheless, this limited analysis was sufficient to indicate a synergistic effect between m.11778G>A and m.14484T>C mutations.

Although a recent extensive analysis of pathogenic LHON mutations [27] did not strictly describe LHON cases based on double mutations, the authors established a putative relationship between LHON mutations belonging to the “top-14” group (excluding the three common mutations), a series of presumed polymorphic variants and haplogroups of the mtDNA molecules. Indeed, the authors discussed a potential synergistic role of some polymorphisms on primary mutations based on their conservation patterns. However, no functional analyses were carried out to establish this.

Here we report a comprehensive molecular characterization of a homoplasmic triple LHON mutation in comparison with single primary mutations and haplogroup-specific controls in a nucleus and environment independent manner. We generated mutant transmitochondrial cybrid cell lines harboring the m.11778G>A (ND4, J1c haplogroup) and m.14484T>C (ND6, Uk1)

single mutations and the concomitant m.11778G>A / m.14484T>C / m.11253T>C triple mutation (ND4, ND6, ND4; TRIPLE, H). All cybrid cells were made by fusing platelets from donors with the immortalized 143B cell line depleted of mtDNA (143B ρ^0) [28].

Our results show a robust defect in mitochondrial function for all the cybrids carrying LHON mutations, but no synergistic effect of the triple LHON case compared with cybrids harboring only one primary mutation. This is consistent with the ophthalmological characteristics found in the triple LHON patient, which are no more severe than the phenotype found in LHON families harboring a single mtDNA mutation.

Materials and Methods

Probands

The triple LHON proband was a 27-year-old woman who experienced slight bilateral vision loss at age 9, with papillary pallor and central scotomas in both eyes. At 22 years of age, optical coherence tomography (OCT) showed a severe loss of thickness of the papillary retinal nerve fiber layer (RNFL). In the last few years, clinical parameters (visual acuity, scotomas, RNFL, papillary pallor, refraction) stabilized, with no additional ophthalmological characteristics of classical LHON symptoms or associated neurological alterations such as headache, eye pain, weakness, or other relevant health disorders.

The patients harboring m.11778G>A and m.14484T>C mutations showed classical LHON symptoms, such as bilateral visual dysfunction, vascular tortuosity of the central retinal vessels,

scotomas, and no pain on eye movement. No other relevant symptoms were found.

The work described here was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki for experiments involving human samples <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. The only human samples used in this work were blood samples for platelet purification and fusion as described. The ethics committees of the Hospital 12 de Octubre and Universidad Autónoma de Madrid approved the study. Written informed consent for research purposes was obtained from all patients.

Cell lines and growth conditions

To perform a precise analysis of the functional effect of mtDNA mutations, we minimized the influence of the nuclear background by isolating and confirming the absence of mtDNA and mitochondrial function in single expanded osteosarcoma 143B ρ^0 cell, which was used as a progenitor for all transmitochondrial fusions. Cybrids were generated by fusion with platelets as described elsewhere [28,29]. Briefly, platelets were centrifuged (15°C, 1,500 x g for 15 min) from plasma and 10^6 ρ^0 cells in 2 ml of complete media were carefully added to the platelet pellet followed by centrifugation at 180 x g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in 100 μ L of 42% polyethylene glycol, incubated for 1 min, and cultured in 10 ml of complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) as described below. After fusion for 12 hours, cells were grown in selective medium without uridine. Individual clones were isolated by limiting dilution and mtDNA was analyzed by RFLP mapping and sequencing.

Seven different cell lines were constructed in total; three from donors harboring the individual

mutations m.11778G>A (ND4, J1c), m.14484T>C (ND6, Uk1) and the triple m.11778G>A / m.14484T>C / m.11253T>C (TRIPLE, H) mutation, and four cell lines from healthy donors with the corresponding haplogroups, K (J1c), K (Uk1), and two for K (H) from different pedigrees. All experiments were performed with two independent clones of each line at least in triplicate, therefore avoiding as much as possible a putative clonal effect [29,30]. To exclude differences due to mtDNA levels after fusion, all cell lines were evaluated for mtDNA copy number several times during experiments. No significant differences were detected after stabilization (data not shown) and all experiments were performed with the cell lines at a similar passage number.

Cells were maintained in complete DMEM supplemented with 4.5 g/l glucose, 10% FBS, 50 μ g/mL uridine and antibiotics. Prior to experiments, cells were cultured for 24 h in DMEM containing 2 g/L glucose and 2.5 g/L galactose (Glu/Gal medium). Cell lines were checked routinely for mycoplasma contamination.

Genetic analysis

Patient DNA was extracted from blood using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). mtDNA was amplified from total DNA in 24 overlapping PCR fragments of approximately 800 bp in length, and both strands were sequenced. mtDNA sequence analysis was carried out using the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of human mitochondrial DNA (GenBank number NC_012920) as a reference. mtDNA samples were classified into mtDNA haplogroups according to their sequence [31].

No LHON-associated mutations other than those described [10] were found in the mtDNA samples.

Primary LHON mutations were analyzed by RFLP in all cybrid lines from patients and healthy donors. PCR conditions were: 30 cycles of 55°C for annealing and 15 sec of polymerization. For m.11778G>A, the forward primer (5'-TTCACCGGCGCAGTCATTCTCATAA-3') and the reverse primer (5'-TGTTGTGGTAAATATGTAGAG-3') generate a 317 bp product containing an internal LweI recognition site in wild-type molecules, whose digestion generates fragments of 223 bp and 94 bp. For m.14484T>C, the forward primer (5'-ATAGCCATCGCTGTAGTATATCCAAAGACAACGA-3') and the reverse primer (5'-CCGTGCGAGAATAATGATGTATGC-3') generate a 236 bp product including a MboI restriction site in wild-type molecules, which generates fragments of 202 bp and 34 bp. All RFLP assays were carried out with positive and negative controls. Diagnostic restriction endonuclease digestions were resolved by 2% or 3% agarose gel electrophoresis for the m.11778G>A and the m.14484T>C, respectively. The m.11253T>C mutation was analyzed by sequencing the 271 bp mtDNA fragment obtained by PCR using as forward primer 5'-CCACACTTATCCCCACCTTG-3' and 5'-AAGTGGAGTCCGTAAAGAGGTATC-3' as a reverse primer with the same PCR conditions as above, but with an annealing temperature of 60°C.

Growth curves

Cell growth was measured in cells seeded in 6-well plates at an initial density of 25,000 cells/well. Growth was monitored over 4 days in DMEM containing either 4.5 g/L glucose or 0.9 g/L galactose as a carbon source. Cells were harvested and counted every 24 hours.

Oxygen consumption

The basal respiration of intact cells was measured at 37°C in Glu/Gal DMEM using a Clark-type oxygen electrode (Hansatech Instruments) as described [32]. At least three independent recordings were obtained to generate a mean.

Lactate production

Lactate was measured in cell culture medium following a 48-h culture period as previously described [33]. Briefly, 1×10^5 cells were plated per well in a 6-well plate in Glu/Gal DMEM. After 48 h, 50 μ L of the medium was removed, deproteinized and frozen until measurement. Lactate was determined with a lactate dehydrogenase-based activity assay (Roche), which results in the production of NADH and an increase in absorbance at 340 nm that is proportional to the lactate present in the samples. The concentration of lactate calculated with a standard curve was normalized to the total amount of protein in the culture dishes measured with the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Assays were performed in triplicate in three independent experiments.

ATP steady-state measurement

Mitochondrial steady-state ATP levels were measured in cells previously incubated with 5 mM 2-deoxy-D-glucose/1 mM pyruvate using the luminometric luciferin-luciferase-based

method (CLS II, Roche Applied Science) as described elsewhere [34]. Experiments were performed in duplicate on at least three independent days.

Measurement of ROS and MIMP

Mitochondrial superoxide production was measured using MitoSOXTM Red (Invitrogen). The mitochondrial inner membrane potential (MIMP) was evaluated as the ratio of tetramethyl rhodamine ester (TMRE, Invitrogen) and MitoTracker Green (MTG, Invitrogen). To perform these assays, 0.75×10^5 cells were grown in Glu/Gal DMEM. After addition of the fluorophores (5 μ M MitoSOXTM Red or 100 nM TMRE and 100 nM MTG) and incubation at 37°C for 30 min in the dark, the cells were collected in Glu/Gal DMEM and analyzed immediately with a Cytomic FC500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter). Forward and side scatter were used to gate the viable population of cells and the mean fluorescence intensity was determined with MXP software (Beckman Coulter). Experiments were performed in duplicate on at least three independent passages.

Enzymatic activity of OXPHOS complexes assays

The activity of the OXPHOS complexes and the enzyme citrate synthase was determined as previously described [35] using a Beckman Coulter DU 800 spectrophotometer.

Complex I assembly

Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) and two-dimensional BN-SDS-PAGE analysis of OXPHOS complexes was performed as previously described [36]. For two-dimensional BN-SDS-PAGE experiments, cells

were grown with 10 μ g/ml chloramphenicol (Sigma) for 2 days to deplete respiratory chain complexes. Cells were then collected 48 h after chloramphenicol removal. The detection of fully-assembled complexes was carried out by western blotting after BN-PAGE using anti-NDUFA9 and anti-CII 70 kDa antibodies (Invitrogen, Mitosciences).

[Ca²⁺]_M measurements

The Ca²⁺-sensitive photoprotein aequorin was used to measure mitochondrial [Ca²⁺] ([Ca²⁺]_M). Cells were plated in 13-mm round coverslips and transfected for expression of mitochondrially-targeted low-Ca²⁺-affinity aequorin (see [37] for more details). Twenty-four-hours later, cells were incubated in standard medium (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 10 mM HEPES, pH 7.4) for 1-2 h with 1 μ M coelenterazine for aequorin reconstitution. Cells were then placed in the perfusion chamber of a purpose-built luminometer. For stimulation of intact cells, cells were perfused with standard medium containing an agonist (100 μ M histamine). For experiments with permeabilized cells, standard medium containing 0.5 mM EGTA instead of Ca²⁺ was perfused for 1 min, followed by 1 min perfusion with intracellular medium (130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 5 mM L-malate, 5 mM glutamate, 20 mM Hepes pH 7) containing 100 μ M digitonin. Then, intracellular medium without digitonin was perfused for 5 min, followed by perfusion with a 4.5 μ M [Ca²⁺] buffer obtained using an EDTA/Ca²⁺/Mg²⁺ mixture. The temperature was set to 37°C. Calibration of the luminescence data into [Ca²⁺] was made using an algorithm adjusted to the

calibration of the aequorin form used, as described [37]. Assays were performed in duplicate with at least three independent experiments.

Statistics

The results were presented as the mean \pm SD. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. A p-value <0.05 was considered as significant.

Results

Comparison of mtDNA molecules

Although literature on LHON mutations is extensive, it is somewhat confusing and on occasion controversial with regards to molecular and clinical consequences. Thus, complex I deficiency varies from 0% to 80% depending on the technical approach used (enzyme activity, ATP synthesis, oxygen consumption, growth on galactose, among others), the system studied (lymphoblasts, platelets, leukocytes, transmitochondrial cybrids), the genetic background (nuclear and mitochondrial) and other factors, including environmental factors [11].

To eliminate as much as possible the involvement of modifying factors, we generated transmitochondrial cybrids harboring different mtDNA mutations and haplogroup-specific controls. This, we believe, permits the most accurate comparison among mtDNA molecules. Similarly, culturing these cells under controlled conditions removes possible environmental factors. In addition, since cybridizations were performed using a common progenitor clone of 143B- ρ^0 , a cell line previously isolated and genetically and functionally confirmed, all

cybrids in this study contain an identical nuclear background.

Haplogroup	Mutation	Cybrid line	Clone
J1c	Wt	K (J1c)	K (J1c) 1 K (J1c) 2
	m.11778G>A	ND4 (J1c)	ND4 (J1c) 1 ND4 (J1c) 2
Uk1	Wt	K (Uk1)	K (Uk1) 1 K (Uk1) 2
	m.14484T>C	ND6 (Uk1)	ND6 (Uk1) 1 ND6 (Uk1) 2
H	Wt	K (H)*	K (H) 1 K (H) 2 K (H) 3 K (H) 4
	m.11778G>A m.14484T>C m.11253T>C	TRIPLE (H)	TRIPLE (H) 1 TRIPLE (H) 2

Table 2. Cybrid cell lines used in this study. *Clones 1 and 2 are from a different family pedigree than 3 and 4.

To overcome the potential clonal variability during cybridization [29,30], we analyzed at least two different clones for each cell line. Thus, the functional behaviour of all cybrid cell lines used (Table 2) is the result of different mtDNA molecules against the same nuclear background and under identical experimental conditions.

Mitochondrial function

Diseases caused by mtDNA mutations present a complex and broad range of clinical and biochemical phenotypes. We therefore analyzed different features of the bioenergetic status of cybrid cell lines. Results from the mutant cell lines were compared with those obtained from their corresponding controls to assess the effect of the mutation without any modifying elements, including haplogroups.

As a first approach, we compared their ability to grow using glucose or galactose as a carbon

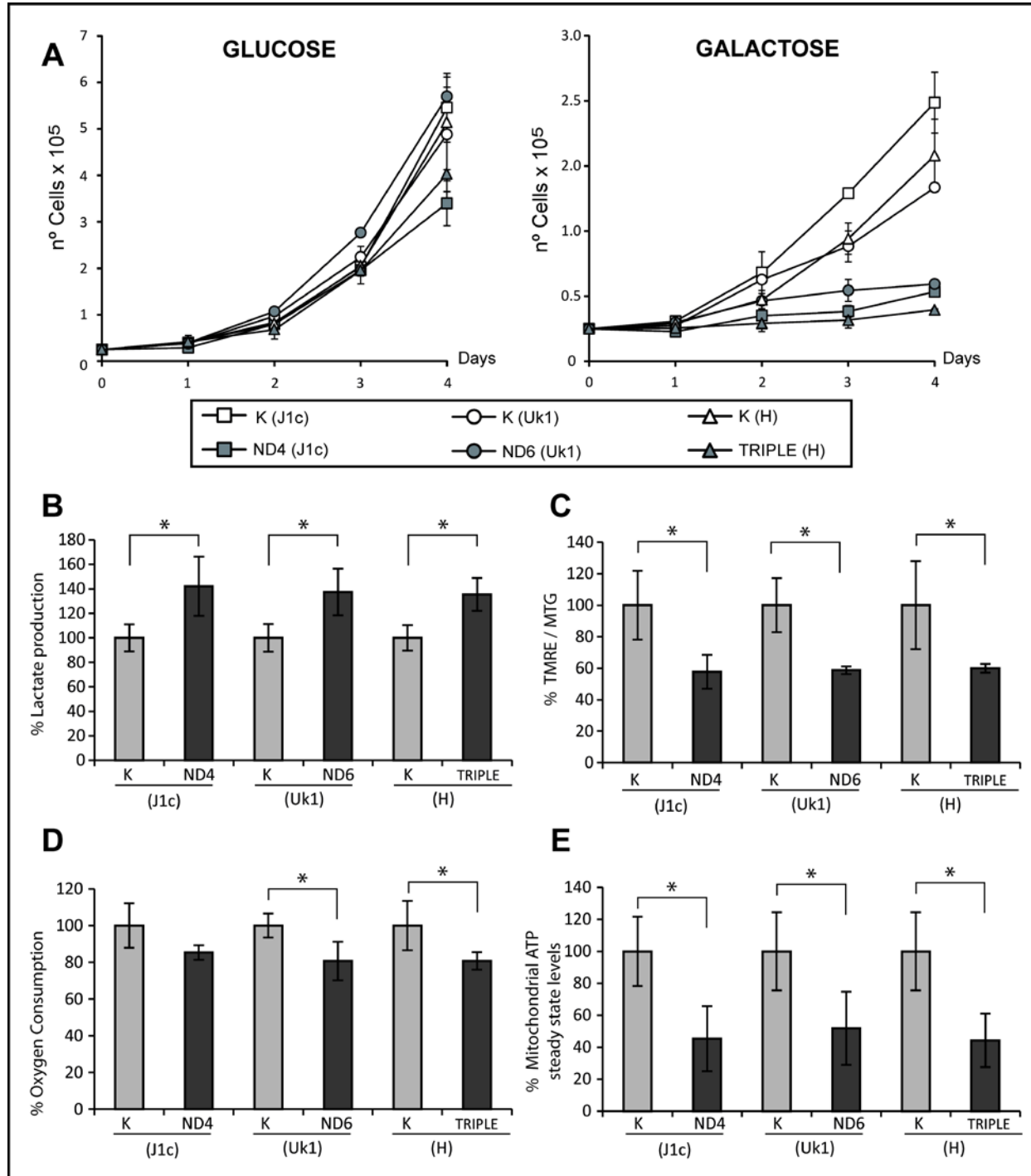


Figure 1. Cybrids carrying the triple mutation show similar biochemical parameters to those with single mutations. (A) Growth analysis of control and mutant cell lines. Cells were grown in glucose or galactose to evaluate their mitochondrial function. Lines represent the mean of two different clones measured in three independent experiments. Error bars represent standard deviation. (B) Lactate production was measured in culture medium following a 48-h culture period and normalized to total amount of protein. (C) Mitochondrial inner membrane potential was evaluated as the ratio of TMRE and MTG fluorescence by flow cytometry. (D) Oxygen consumption of 4×10^6 cells was recorded for 30 minutes using a Clark-type O₂ electrode. (E) Mitochondrial steady-state ATP was measured in cells incubated with 5 mM 2-deoxy-D-glucose and 1 mM pyruvate for 2.5 h. ATP was normalized to the total amount of protein. Bars in histograms are the mean from two different clones measured in three independent experiments. Data are represented as percentage relative to their haplogroup control. Error bars indicate standard deviation. * $p < 0.05$ determined by one way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

source. All cybrid cell lines showed comparable growth rates after 4 days in high glucose medium (Fig. 1A); however, when cells were switched to galactose medium, forcing a dependence on mitochondrial function [38], the cybrid lines with LHON mutations showed a clear growth defect compared with control cells. No significant differences were found between the triple LHON cybrids and single mutants (Fig. 1A). Glycolysis and oxidative metabolism are highly regulated in the vast majority of cells. A decrease in oxidative metabolism capacity, such as that resulting from mtDNA mutation, reduces pyruvate flux into mitochondria, forcing its transformation to lactate [39]. Because lactate is balanced inside and outside of the cell by monocarboxylate transporters [40], the oxidative metabolism state can be assessed by measuring lactate levels in culture medium. Culture medium from mutant cell lines contained significantly more lactate (approximately 40%) as compared with their corresponding controls. Moreover, this increase was comparable in all mutant cybrid lines independent of the mutation (Fig. 1B).

The electrical potential or charge density of the mitochondrial inner membrane is a good indicator of the correct function of the electron transport chain (ETC). To measure this, we used flow cytometry to calculate the TMRE/MTG ratio in cells. TMRE is an inner membrane potential-dependent fluorescent dye that is readily sequestered by active mitochondria. Since the signal emitted by TMRE is dependent on mitochondrial mass, MTG (a membrane potential-insensitive mitochondrial mass dye) is loaded in the same experiment to measure the charge/ mitochondrial mass relationship. A

significant decrease in the TMRE/MTG ratio (approximately 40%) was detected in all mutant lines as compared with their corresponding controls. Again, no differences were detected between the mutations (Fig. 1C).

To further investigate the mitochondrial molecular defects associated with LHON mutations, we next analyzed the respiratory chain capacity by measuring oxygen consumption in intact cells. Compared with their respective controls, all cybrid cell lines showed a similar and moderate decrease in oxygen consumption, which was significant for the ND6 and triple H mutations (Fig. 1D). These results are consistent with those previously described in the LHON literature [13,15,41,42,43], confirming that a complex I dysfunction leads to a decrease in respiratory capacity.

ATP production is a frequently measured parameter in mitochondrial pathology and particularly in LHON studies since its synthesis is the terminal step of OXPHOS. Most studies describe a severe reduction in mitochondrial ATP production by the three common LHON mutations and, consequently, it is proposed as one of the key factors in the pathophysiology of the disease [44,45]. As anticipated, mitochondrial steady-state ATP levels were significantly decreased by approximately 50% in all cybrid cells tested and no differences were detected between the different mutant cell lines (Fig. 1E).

Complex I performance: enzymatic activity and superoxide production

Generation of complex I deficiencies by the three primary LHON mutations is commonly

accepted. However, the degree of deficiency is controversial because of the marked variability described in the literature, in part due to differences in experimental approaches. Accordingly, complex I deficiency ranges from a weak to an 80% reduction in specific activity when compared with controls [41]. This variability also depends on the mutation and only m.3460G>A (ND1) was invariably described to cause a substantial and significant decline of complex I activity [46]. By contrast, a modest decrease of enzyme activity was observed in several studies analyzing mutations in the ND6 subunit (m.14484T>C) [42] or in ND4 (m.11778G>A) [41,47]. Remarkably, in the unique double LHON study with available biochemical data for complex I, the proband presented consistently lower complex I activity than those harboring single mutations [15].

The specific activity of the respiratory chain complexes was measured in cybrid cell lines and normalized to citrate synthase activity. A significant decrease in complex I activity was detected in all mutant cybrid lines (of approximately 50%), with no significant differences between the mutations (Fig. 2A). To evaluate whether the mutations were associated with an isolated complex I defect, the activity of complex II, complex III and complex IV was also measured in the triple LHON cell line and haplogroup H control cells. No differences were detected in the other OXPHOS complexes, confirming the isolated complex I defect (Fig. 2B).

ROS production is generally associated with impairments of the respiratory chain. It has been hypothesized that, in addition to an ATP

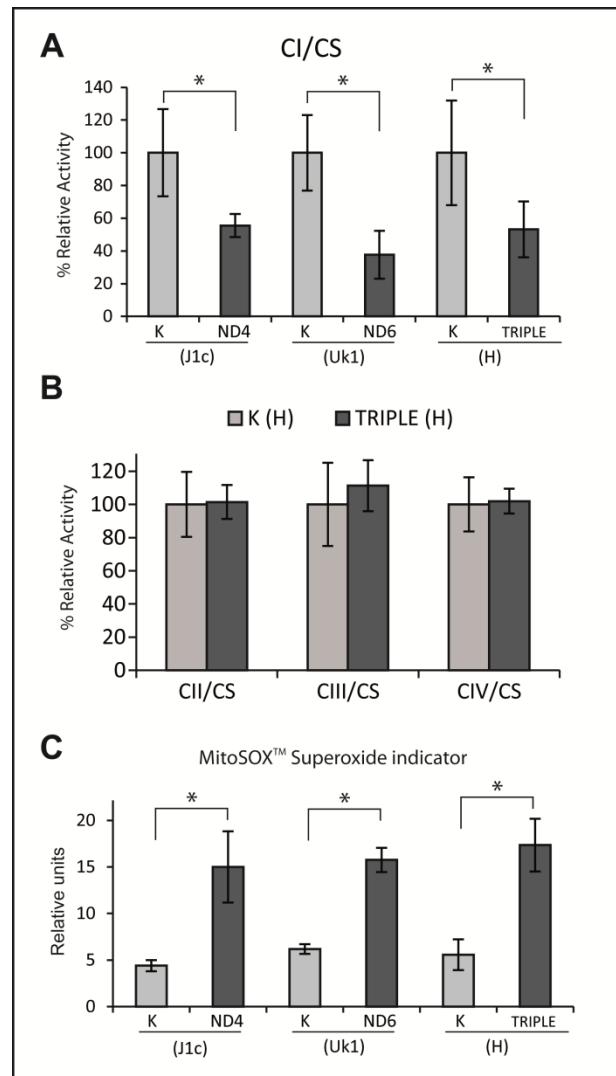


Figure 2. Complex I performance: mutants show the same extent of decreased complex I enzymatic activity and increased ROS production to controls. (A) Enzymatic activity of complex I was measured in all cell lines. (B) Complex II, complex III and complex IV activity in cybrids lines harboring the triple mutation and their controls from haplogroup H. In B and C, data for each cell line was normalized to the activity of citrate synthase and represented as percentage of their control haplogroup. (C) Superoxide levels were measured with MitoSOXTM and flow cytometry. Data for all the experiments represent the mean of two independent clones from three experiments. Error bars are the standard deviation. * $p < 0.05$ determined by one way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

synthesis defect, increased ROS production may be responsible for the neurodegeneration effects underlying LHON [13]. Since impairment of electron flow through complex I leads to a higher proportion of reduced FMN that reacts with oxygen, increasing superoxide formation [48,49,50], we hypothesized that higher ROS levels could be present in cybrid mutants.

Accordingly, mitochondrial superoxide production was evaluated with MitoSOX™ and significantly increased levels of superoxide were detected in cybrid lines containing mtDNA from LHON patients as compared with their respective controls (Fig. 2C). However, the differences were not significantly different between the triple LHON mutant and the single mutants. These results are in accordance with the proposed model of ROS generation and with the biochemical characterization and complex I activity, and demonstrate that the triple mutant does not generate more ROS since it has no additional mitochondrial defect.

Complex I Assembly

The importance of respiratory chain supercomplexes has been demonstrated by numerous studies in recent years [51,52,53], but their precise function and clinical relevance is still unclear. Nevertheless, it seems reasonable that supercomplexes would confer an advantage by physically facilitating electron transfer through the intimate association of different components of the ETC, thereby enhancing the efficiency of the process and decreasing the collateral ROS production [53]. A delayed kinetic of OXPHOS complex assembly has been postulated as a key factor in LHON pathogenesis, and the association of specific

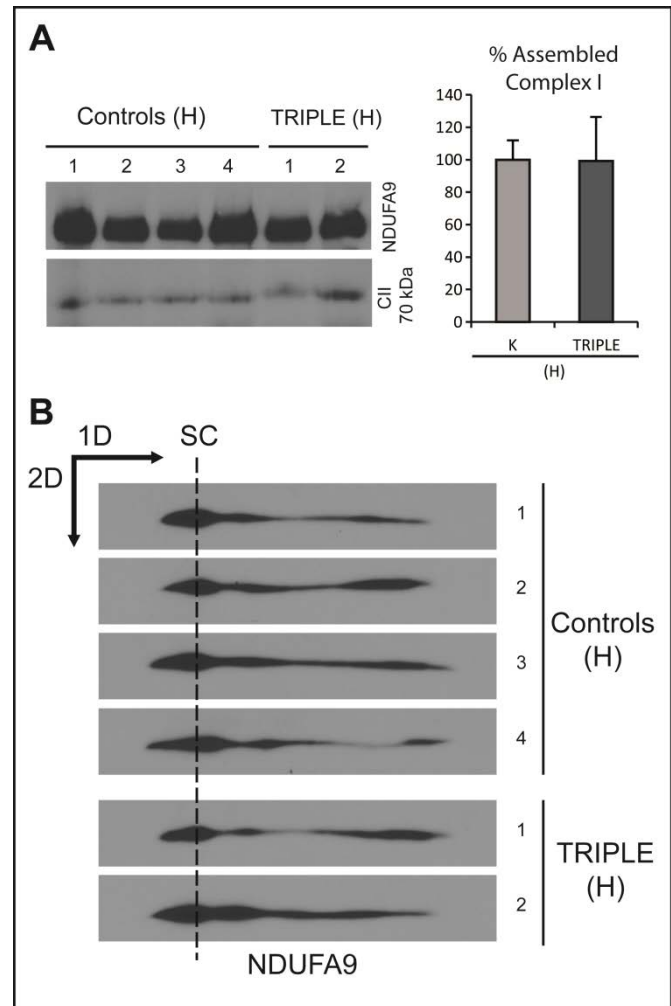


Figure 3. Assembly of complex I is not altered in the triple mutant. (A) Left panel: Steady-state levels of fully assembled complex I were evaluated in the triple mutant cybrid clones and in controls by BN-PAGE. Fully assembled complex I, and complex II, was determined by western blotting using antibodies recognizing NDUF9 and CII 70 kDa, respectively. Right panel: quantification of 4 control clones and 2 triple clones from two independent gels and normalized to complex II, represented as percentage of the controls. (B) BN-SDS-PAGE of individual clones after 48 h of recovery from chloramphenicol treatment (see Materials and methods). Experiments were performed at least by duplicate. SC indicates supercomplexes containing complex I.

haplogroups with the primary LHON mutation is considered one of the possible modulating factors for the disease [27,54]. In these studies, the deleterious effect of the mutations for the performance of the ETC could be exacerbated under stress conditions due to a diminished proportion of assembled supercomplexes.

We analyzed the steady-state levels of complex I and the kinetics of its assembly. The former was carried out in triple LHON cybrid cells and their haplogroup controls by BN-PAGE. Complex II was used as an internal reference to account for variations in the mitochondrial mass. No significant differences were observed in the steady-state levels of fully assembled complex I in the triple mutant as compared with the wild-type haplogroup control cells (Fig. 3A), as previously described for other LHON cybrids [54]. To analyze the kinetics of complex I assembly, we first depleted the OXPHOS protein complexes by chloramphenicol treatment. Analysis of subassembly patterns by two-dimensional BNSDS-PAGE of the triple LHON cybrids and controls demonstrated a similar assembly recovery (Fig. 3B), strongly suggesting that triple LHON mutants do not have a complex I assembly defect, in contrast to previous results with some single mutation [54].

[Ca²⁺]_M measurements

Mitochondrial Ca²⁺ uptake is strictly dependent on mitochondrial membrane potential and is a good parameter of mitochondrial function [55]. We measured mitochondrial Ca²⁺ uptake in triple LHON cybrids with or without permeabilization of the cells. Mitochondrial Ca²⁺ uptake was triggered by stimulation of intact cells with histamine to release Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum.

Using permeabilized cells, mitochondrial Ca²⁺ uptake was directly induced by perfusion of a controlled [Ca²⁺] buffer. Neither agonist-induced (Fig. 4A,B) nor perfusion-induced (Fig. 4C,D) Ca²⁺ mitochondrial uptake was affected in the triple mutated cybrids. Since it is well documented that mitochondrial dysfunction

leads to mitochondrial calcium alterations [55,56], our results suggest that the LHON mutations described here are not sufficiently severe to alter mitochondrial Ca²⁺ homeostasis.

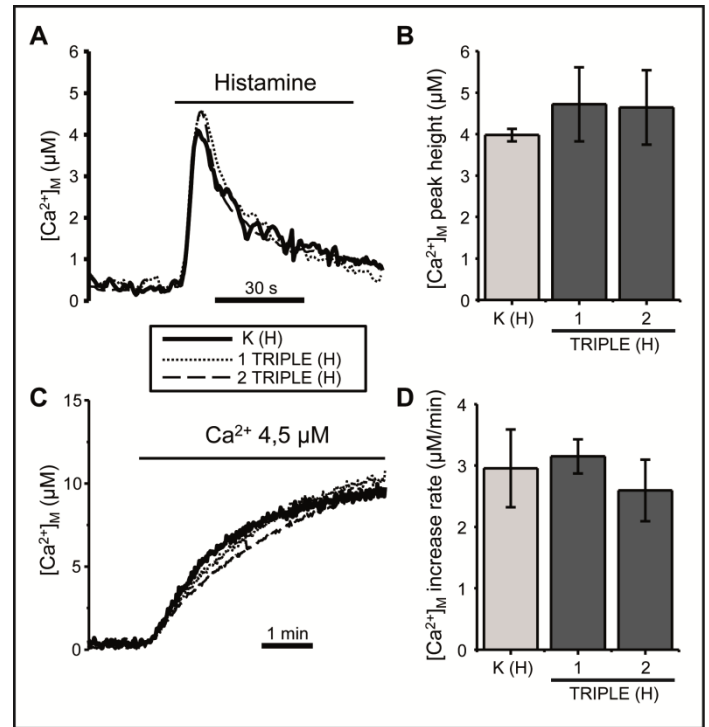


Figure 4. The triple LHON mutation does not affect mitochondrial [Ca²⁺] homeostasis. Mitochondrial Ca²⁺ uptake was measured under two different conditions in control cybrids and in cybrids harboring the triple mutation. (A) Intact cells were stimulated with 100 μM histamine, an agonist that induces Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. The traces depict the mean of four experiments. (B) Integration of means ± SD of the peak heights (peak-basal) obtained in four measurements performed in each clone. The differences were not significant (one-way ANOVA test). (C) A 4.5 μM Ca²⁺ buffer was perfused in permeabilized cells as indicated. The traces depict the mean of three similar experiments. (D) Bars show the mean ± SD of the rates of [Ca²⁺]_M increase obtained in three independent experiments. No significant differences were obtained.

Discussion

We evaluated mitochondrial dysfunction caused by the first described case described of a mtDNA molecule harboring three LHON associated mutations in comparison with two of the most common single mutations causing LHON and their corresponding haplogroup controls.

Studies of the most frequent LHON mutations in the literature indicate that these mutations are usually responsible for a subtle defect in mitochondrial function. Therefore, if the coexistence of three non-severe mutations has additive effect on mitochondrial function it should be easily detected. Moreover, because we used different clones with identical nuclei for each mutation under the same experimental conditions, our results reconcile some conflicting data in the literature regarding the impact of LHON mutations, probably as a consequence of differences in experimental methods and materials.

All functional and biochemical parameters analyzed in this study correlated well with each other and with the expected results, and revealed a defective OXPHOS system with a concomitant increase in glycolysis in all the cybrid cell lines harboring LHON mutations. The only exceptions to this were the calcium dynamics and the complex I assembly kinetics.

The involvement of mitochondria in calcium homeostasis is well documented [55,57]. Furthermore, alterations in calcium homeostasis have been described in several severe mitochondrial pathologies [56,58]. However, the

relationship between LHON and calcium homeostasis in a cybrid model has been described in only one study [59]. Accordingly, in teratoma-derived cybrids, the m.11778G>A (ND4) mutation alters the calcium buffering ability of mitochondria. However, in our osteosarcoma-derived cybrid model, we failed to find any disarrangement in calcium homeostasis for the potentially more severe triple LHON mutation, possibly suggesting that the MIMP decrease in LHON 143B-derived cybrids is not sufficient to alter calcium import into mitochondria.

The assembly of the respiratory chain complexes is essential to maintain a proper OXPHOS function; indeed, defects in this highly regulated process are associated with different pathologies [60]. Alterations of complex I assembly have been described in LHON, suggesting a possible mechanism for the pathogenesis of the disease pathogenesis [54]. However, no defect in complex I assembly was detected in the triple mutant in the present study. We conclude from this that the mild OXPHOS impairment caused by LHON mutations was not the result of an assembly defect in complex I.

It is clear that the three simultaneous mutations do not exert an additive effect on complex I or mitochondrial dysfunction since none of the studied parameters showed a more severe defect in the triple LHON cybrids compared with cybrids carrying either m.11778G>A or m.14484T>C single mutations. A study of the isolated m.11253T> C mutation would be interesting to rule out the rare possibility of a compensating effect, unfortunately, we did not have access to patients harboring this mutation.

To our knowledge, this is the first exhaustive study on the potential synergistic effect of concomitant LHON-associated mutations. We carried out a rigorous and controlled analysis of mtDNA mutations independent of potentially confounding factors, including nuclear DNA, mtDNA haplogroup and copy number and environment or experimental conditions. Furthermore, we evaluated a large number of molecular parameters in batch experiments and all of them point to the absence of a synergistic effect among the three concomitant LHON mutations analyzed. These results are consistent with the clinical characteristics of the patient, who presents a phenotype similar to many other patients harboring single LHON mutations, including those studied in this work. The similar alteration in mitochondrial activity we observe in our cell lines when compared with the clinical and molecular disorders shown in patients and other cell systems strongly suggests a relevant role for ancillary factors in the expression of this disease [11].

A possible, but speculative, explanation for why concomitant mutations in different subunits of a multiprotein complex produce a phenotype equivalent to that observed with single mutations involves the structure/function relationship and interactions of subunits. Notwithstanding the different proposed functions of ND4 and ND6, the m.11778G>A (ND4) and m.14484T>C (ND6) mutations affect complex I function in an indistinguishable molecular manner and produce the same phenotype in patients, LHON. The simplest interpretation would be to consider that although different single mutations alter the interactions between complex I subunits, the

final functional outcome is the same. Concomitant mutations would result in a disruption in proton and electron flow similar to that observed with the more deleterious single mutation, and would be a limiting factor. Since the single LHON mutations analyzed caused similar complex I defects, perhaps through a common pathogenic mechanism, an additive effect might not be produced when they coexist.

Nevertheless, it is difficult to make a theoretical prediction about putative synergistic effects of co-occurring mutations in the same complex, particularly if many structural and functional aspects of that complex are still unknown, which is the case for respiratory chain complex I. Moreover, the discrepancies in the literature on LHON patients, and different cellular models used, cannot exclude the involvement of particular forms of nuclear subunits, which could modulate, positively or negatively, the integration of all nuclear and mitochondrial subunits and, consequently, the molecular and clinical phenotype. Undoubtedly, much more work is still necessary to unravel the complex relationships among concomitant mutations in mtDNA.

Acknowledgments

We acknowledge the excellent technical assistance of Pilar Alvarez-Illera for calcium assays and Laura Molero Martín for flow cytometry analysis carried out at the “Servicio Interdepartamental de Investigación” (SIdI) of Universidad Autónoma de Madrid. We thank Eduardo Ruiz-Pesini for providing cells harboring wild type mtDNA that allowed us to obtain control cybrid lines.

References

1. Zickermann V, Drose S, Tocilescu MA, Zwicker K, Kersch S, et al. (2008) Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Bioenerg Biomembr* 40: 475-483.
2. Hunte C, Zickermann V, Brandt U (2010) Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* 329: 448-451.
3. Drose S, Krack S, Sokolova L, Zwicker K, Barth HD, et al. (2011) Functional Dissection of the Proton Pumping Modules of Mitochondrial Complex I. *Plos Biology* 9.
4. Efremov RG, Baradaran R, Sazanov LA (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465: 441-445.
5. Brandt U (2011) A two-state stabilization-change mechanism for proton-pumping complex I. *Biochim Biophys Acta* 1807: 1364-1369.
6. Hirst J (2013) Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* 82: 551-575.
7. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT (2012) Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1817: 851-862.
8. DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M (2013) The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol* 9: 429-444.
9. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, et al. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-1430.
10. Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, Xie HM, Chalkia D, et al. (2013) mtDNA Variation and Analysis Using MITOMAP and MITOMASTER. *Curr Protoc Bioinformatics* 1: 1 23 21-21 23 26.
11. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF (2009) Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* 46: 145-158.
12. Riordan-Eva P, Harding AE (1995) Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med Genet* 32: 81-87.
13. Kirches E (2011) LHON: Mitochondrial Mutations and More. *Curr Genomics* 12: 44-54.
14. Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488.
15. Brown MD, Allen JC, Van Stavern GP, Newman NJ, Wallace DC (2001) Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *Am J Med Genet* 104: 331-338.
16. Howell N, Miller NR, Mackey DA, Arnold A, Herrnstadt C, et al. (2002) Lightning strikes twice: Leber hereditary optic neuropathy families with two pathogenic mtDNA mutations. *J Neuroophthalmol* 22: 262-269.

17. Tonska K, Kurzawa M, Ambroziak AM, Korwin-Rujna M, Szaflik JP, et al. (2008) A family with 3460G>A and 11778G>A mutations and haplogroup analysis of Polish Leber hereditary optic neuropathy patients. *Mitochondrion* 8: 383-388.
18. Harding AE, Sweeney MG, Govan GG, Riordan-Eva P (1995) Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am J Hum Genet* 57: 77-86.
19. Zhang J, Zhou X, Zhou J, Li C, Zhao F, et al. (2010) Mitochondrial ND6 T14502C variant may modulate the phenotypic expression of LHON-associated G11778A mutation in four Chinese families. *Biochem Biophys Res Commun* 399: 647-653.
20. Zhang S, Wang L, Hao Y, Wang P, Hao P, et al. (2008) T14484C and T14502C in the mitochondrial ND6 gene are associated with Leber's hereditary optic neuropathy in a Chinese family. *Mitochondrion* 8: 205-210.
21. Shu L, Zhang YM, Huang XX, Chen CY, Zhang XN (2012) Complete mitochondrial DNA sequence analysis in two southern Chinese pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy revealed secondary mutations along with the primary mutation. *Int J Ophthalmol* 5: 28-31.
22. Qiao C, Wei T, Hu B, Peng C, Qiu X, et al. (2015) Two families with Leber's hereditary optic neuropathy carrying G11778A and T14502C mutations with haplogroup H2a2a1 in mitochondrial DNA. *Mol Med Rep* 12: 3067-3072.
23. Wei QP, Zhou X, Yang L, Sun YH, Zhou J, et al. (2007) The coexistence of mitochondrial ND6 T14484C and 12S rRNA A1555G mutations in a Chinese family with Leber's hereditary optic neuropathy and hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 910-916.
24. Khan NA, Govindaraj P, Jyothi V, Meena AK, Thangaraj K (2013) Co-occurrence of m.1555A>G and m.11778G>A mitochondrial DNA mutations in two Indian families with strikingly different clinical penetrance of Leber hereditary optic neuropathy. *Mol Vis* 19: 1282-1289.
25. Melberg A, Moslemi AR, Palm O, Raininko R, Stalberg E, et al. (2009) A patient with two mitochondrial DNA mutations causing PEO and LHON. *Eur J Med Genet* 52: 47-48.
26. Mimaki M, Ikota A, Sato A, Komaki H, Akanuma J, et al. (2003) A double mutation (G11778A and G12192A) in mitochondrial DNA associated with Leber's hereditary optic neuropathy and cardiomyopathy. *J Hum Genet* 48: 47-50.
27. Achilli A, Iommarini L, Olivieri A, Pala M, Hooshyar Kashani B, et al. (2012) Rare primary mitochondrial DNA mutations and probable synergistic variants in Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS One* 7: e42242.
28. King MP, Attardi G (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with

- exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246: 500-503.
29. Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, et al. (1994) Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 54: 966-974.
 30. Hao H, Morrison LE, Moraes CT (1999) Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Hum Mol Genet* 8: 1117-1124.
 31. Gallardo ME, Garcia-Pavia P, Chamorro R, Vazquez ME, Gomez-Bueno M, et al. (2012) Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *Eur Heart J* 33: 346-353.
 32. Echevarria L, Clemente P, Hernandez-Sierra R, Gallardo ME, Fernandez-Moreno MA, et al. (2014) Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase is essential for mammalian mitochondrial translation in vivo. *Biochemical Journal* 460: 91-101.
 33. Cruz-Bermudez A, Vallejo CG, Vicente-Blanco RJ, Gallardo ME, Fernandez-Moreno MA, et al. (2015) Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. *Oncotarget* 6: 13628-13643.
 34. Vallejo CG, Cruz-Bermudez A, Clemente P, Hernandez-Sierra R, Garesse R, et al. (2013) Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis. *Biochimie* 95: 1171-1176.
 35. Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, et al. (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9: 331-339.
 36. Calvaruso MA, Smeitink J, Nijtmans L (2008) Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods* 46: 281-287.
 37. Montero M, Lobaton CD, Moreno A, Alvarez J (2002) A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190. *FASEB J* 16: 1955-1957.
 38. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC (1992) Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol* 48: 122-126.
 39. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A (2011) The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 1807: 568-576.
 40. Halestrap AP, Wilson MC (2012) The monocarboxylate transporter family--

- role and regulation. *IUBMB Life* 64: 109-119.
41. Brown MD, Trounce IA, Jun AS, Allen JC, Wallace DC (2000) Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J Biol Chem* 275: 39831-39836.
 42. Carelli V, Ghelli A, Bucchi L, Montagna P, De Negri A, et al. (1999) Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Annals of Neurology* 45: 320-328.
 43. Hofhaus G, Johns DR, Hurko O, Attardi G, Chomyn A (1996) Respiration and growth defects in transmitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Biol Chem* 271: 13155-13161.
 44. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF (2011) Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 30: 81-114.
 45. Baracca A, Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baruzzi A, et al. (2005) Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch Neurol* 62: 730-736.
 46. Majander A, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Wikstrom M (1991) Electron-Transfer Properties of NADH - Ubiquinone Reductase in the Nd1/3460 and the Nd4/11778 Mutations of the Leber Hereditary Optic Neuroretinopathy (Lhon). *Febs Letters* 292: 289-292.
 47. Carelli V, Ghelli A, Ratta M, Bacchilega E, Sangiorgi S, et al. (1997) Leber's hereditary optic neuropathy: Biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with the mitochondrial genotype. *Neurology* 48: 1623-1632.
 48. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417: 1-13.
 49. Barrientos A, Moraes CT (1999) Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *Journal of Biological Chemistry* 274: 16188-16197.
 50. Lenaz G, Baracca A, Carelli V, D'Aurelio M, Sgarbi G, et al. (2004) Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. *Biochim Biophys Acta* 1658: 89-94.
 51. Moreno-Lastres D, Fontanesi F, Garcia-Consuegra I, Martin MA, Arenas J, et al. (2012) Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 15: 324-335.
 52. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, et al. (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340: 1567-1570.
 53. Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML (2013) Mitochondrial

- Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxid Redox Signal*.
54. Pello R, Martin MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, et al. (2008) Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 17: 4001-4011.
 55. Brini M, Pinton P, King MP, Davidson M, Schon EA, et al. (1999) A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nat Med* 5: 951-954.
 56. von Kleist-Retzow JC, Hornig-Do HT, Schauen M, Eckertz S, Dinh TA, et al. (2007) Impaired mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels. *Exp Cell Res* 313: 3076-3089.
 57. Trevelyan AJ, Kirby DM, Smulders-Srinivasan TK, Nooteboom M, Acin-Perez R, et al. (2010) Mitochondrial DNA mutations affect calcium handling in differentiated neurons. *Brain* 133: 787-796.
 58. Moudy AM, Handran SD, Goldberg MP, Ruffin N, Karl I, et al. (1995) Abnormal calcium homeostasis and mitochondrial polarization in a human encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 729-733.
 59. Haroon MF, Fatima A, Scholer S, Gieseler A, Horn TF, et al. (2007) Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): studies of cybrid cells bearing 11,778 mutation. *Neurobiol Dis* 28: 237-250.
 60. Ghezzi D, Zeviani M (2012) Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol* 748: 65-106.

3.2 CAPITULO 2

Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis

Carmen G. Vallejo, **Alberto Cruz-Bermúdez**, Paula Clemente, Rosana Hernández-Sierra, Rafael Garesse, Miguel Quintanilla.

Resumen capítulo 2:

La reprogramación metabólica o efecto Warburg es uno de los sellos característicos de las células tumorales.

En este trabajo se estudió la función mitocondrial en una serie de 4 líneas celulares epiteliales, MCA3D, PB, A5 y CarC con un potencial tumorigénico creciente. Se analizaron el índice BEC (Bioenergetic cellular index) y el índice Glu/Gal como medidas indirectas de la proporción entre función glucolítica y función mitocondrial.

De acuerdo con el efecto Warburg se encontró una disminución del índice BEC y un aumento del ratio Glu/Gal, (es decir, un aumento de la función glucolítica comparada con la función mitocondrial) a medida que aumenta la tumorigenicidad de las líneas celulares.

Esta adaptación metabólica parece no ser debida a una disfunción en el sistema OXPHOS ya que los niveles de ATP mitocondrial, la cantidad de subunidades individuales y los niveles de complejos ensamblados así como sus actividades enzimáticas no disminuyeron con la progresión tumoral. Además, no se encontró mayor producción de superóxido mitocondrial, pero si un aumento de ROS citoplasmáticos.

Estos resultados apoyan la teoría de que la mitocondria no tiene por qué estar necesariamente afectada en las células tumorales, pero si el metabolismo energético celular, que es reprogramado hacia un aumento de la glucolisis aerobia para apoyar el crecimiento anabólico.

El doctorando realizó los estudios de ATP mitocondrial, ROS mitocondriales, y mediante BN-PAGE, de los complejos OXPHOS y de su actividad enzimática en gel, así como participó en la creación de las figuras.



Research paper

Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis



Carmen G. Vallejo^{a,b,c,*}, Alberto Cruz-Bermúdez^{a,b,c}, Paula Clemente^{a,b,c},
Rosana Hernández-Sierra^{a,b,c}, Rafael Garesse^{a,b,c,*}, Miguel Quintanilla^{a,d,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)–Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), Facultad de Medicina, UAM, Madrid, Spain

^c Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital 12 de Octubre (i + 12), Madrid, Spain

^d Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (idipaz), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2012

Accepted 4 January 2013

Available online 22 January 2013

Keywords:

Mitochondria

Glycolysis

Metabolic reprogramming

ROS

Carcinogenesis

ABSTRACT

Metabolic reprogramming from mitochondrial aerobic respiration to aerobic glycolysis is a hallmark of cancer. However, whether it is caused by a dysfunction in the oxidative phosphorylation pathway is still under debate. In this work, we have analyzed the bioenergetic cellular (BEC) index and the relative cell ability to grow in the presence of either galactose or glucose as sources of sugar (Gal/Glu index) of a system formed by four epidermal cell lines with increasing tumorigenic potentials, ranging from nontumorigenic to highly malignant. We find that the BEC index gradually decreases whereas the Gal/Glu index increases with tumorigenicity, indicating that a progressive metabolic adaptation to aerobic glycolysis occurs in tumor cells associated with malignancy. Interestingly, this metabolic adaptation does not appear to be caused by damaged respiration, since the expression and activity of components of the respiratory chain complexes were unchanged in the cell lines. Moreover, the corresponding mitochondrial ATP synthetic abilities of the cell lines were found similar. The production of reactive oxygen species was also measured. A shift in ROS generation was found when compared nontumorigenic with tumorigenic cell lines, the latter exhibiting about threefold higher ROS levels than nontumorigenic cells. This result indicates that oxidative stress is an early event during tumor progression.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

In 1927, Otto Warburg put forward the hypothesis that cancer cells undergo a shift in their metabolism from mitochondrial aerobic respiration to glycolysis followed by lactic acid fermentation that would occur even under normoxic conditions. Warburg also proposed that this altered metabolism is caused by defects in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathway [1]. A bioenergetic signature of cancer cells was proposed by Cuezva and collaborators who showed that the expression of mitochondrial and glycolytic enzymatic markers varies significantly when comparing human carcinomas with paired normal tissues [2]. These authors analyzed a wide variety of tumors, including liver, kidney, colon, breast, lung,

gastric and esophageal carcinomas, and concluded that OXPHOS function is reduced during neoplastic transformation. They defined a bioenergetic cellular index, the BEC index, which could be used to estimate the mitochondrial status in human tumors. However, the concept that the respiration of cancer cells is damaged is highly debated, in particular, since the discovery that proto-oncogenes and tumor suppressor genes besides regulating signal transduction pathways involved in cell cycle control also affect cellular metabolism [3,4]. Nowadays, the idea that metabolic reprogramming is a hallmark of cancer is well established, regardless of whether the cause is or is not a defective respiration [3,5].

In this work, we have analyzed the OXPHOS status relative to glycolysis in a model of mouse skin carcinogenesis formed by four cell lines with increasing tumorigenic abilities. Mouse skin chemical carcinogenesis is a well-characterized model system to study the genetic and biochemical changes associated with tumor initiation, promotion and progression. In this model, tumors are induced on the skin of mice by treatment with chemicals, either by the “two-stage” or “complete” carcinogenesis protocols [6]. The

* Corresponding authors. Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC–UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 915854425; fax: +34 915854401.

E-mail addresses: cvallejo@iib.uam.es (C.G. Vallejo), rafael.garesse@iib.uam.es (R. Garesse), mquintanilla@iib.uam.es (M. Quintanilla).

two-stage protocol involves treatment with a single dose of a carcinogen; i.e., 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) followed by repeated applications of the tumor promoter 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), which gives rise to the appearance of benign papillomas. A small fraction of papillomas spontaneously progress to malignant squamous cell carcinomas (SCCs), which lately can undergo an epithelial–mesenchymal conversion and form highly aggressive spindle cell carcinomas (SpCC) [7]. Complete carcinogenesis, on the other hand, involves repeated applications of the carcinogen DMBA. Here, DMBA-induced cell lines corresponding to different stages of skin carcinogenesis were used to evaluate whether OXPHOS dysfunctions that lead to increased glycolytic activity occur associated with tumor progression.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines, culture conditions and Gal/Glu index determination

MCA3D cells were derived by treatment of a primary mouse epidermal keratinocyte culture with DMBA, followed by selection in high calcium medium that induces terminal differentiation of normal keratinocytes [8]. PB cells were obtained from a papilloma induced by two-stage carcinogenesis [9]. The A5 cell line was derived from the spindle component of a skin carcinoma induced by complete carcinogenesis [10], and CarC cells were explanted from a carcinoma induced by two-stage carcinogenesis [11]. A summary of the origin and characteristics of the cell lines is presented in Supplementary material (Table S1). MCA3D and PB cells have normal *H-Ras* genes, while both CarC and A5 cell lines exhibit an identical mutation at codon 61 of *H-Ras* [8,11,12]. Moreover, CarC cells show complete loss of the normal *H-Ras* allele [11] and have the *Ink4* locus encoding the cell cycle regulators p15^{Ink4b}, p16^{Ink4b} and p19^{Arf} deleted [13]. A5 cells, on the other hand, have inactivated the tumor suppressor *Trp53* gene encoding p53 [10], whereas CarC has normal *Trp53* [14]. Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)–Ham's F12 medium (1:1) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics: 100 µg/ml ampicillin, 60 µg/ml gentamicin and 2.5 µg/ml amphotericin B. Cells were grown at 37 °C in a 5% CO₂-humidified atmosphere.

To compare the cell abilities to grow in the presence of either glucose or galactose as a sugar source, cells were transferred to sugar-free DMEM medium (Gibco) containing glucose (4.5 g/l) or galactose (0.9 g/l) plus the supplements cited above. Cells were incubated up to 8 days, refreshing the medium every 2 days. Doubling times were calculated by applying the suitable formula $DT = \log 2 \times (t - t_0) / \log N - \log N_0$, where $(t - t_0)$ is the total days of incubation and N_0 and N , the number of cells at the beginning and end of incubation, respectively. The Gal/Glu index is the ratio of the corresponding doubling times.

2.2. Tumorigenicity assay

Cells were collected, washed with PBS (without calcium) and intradermally/subcutaneously injected at the two flanks of 8 week-old Balb/c female athymic nude mice (Harlan). Each animal received approximately 2×10^6 cells/site. Tumor development was measured about twice per week and the size of tumors calculated from caliper measurements of two orthogonal diameters.

2.3. Western-blot analysis and BEC index determination

Collected cells were centrifuged and pellets frozen at –20 °C until use. Pellets were lysed in cold RIPA buffer supplemented with complete protease inhibitors cocktail (Roche). The homogenates

were kept in ice for at least 15 min and, if necessary, passed through a needle (0.4 × 13 mm) to clarify the extracts before centrifuging at 13,000 rpm and 4 °C for 10 min. The supernatants were saved and the protein content determined with the BCA protein assay kit (Pierce). Extracts were stored frozen until use.

Protein extracts (20 µg) were separated in 10% SDS-PAGE gels and electrotransferred to either Immobilon-P or nitrocellulose membranes (Millipore). In order to determine the BEC index, membranes were probed with a polyclonal antibody against β-ATPase [15] and, subsequently, with monoclonal antibodies recognizing Hsp60 and GAPDH (Stressgen). Appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were used, and peroxidase activity was developed using either an enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham) or the Odyssey detection system (nitrocellulose filters). The signals obtained for each enzyme were quantified by densitometric analysis with Image J program. The BEC index was calculated dividing the ratio β-ATPase/Hsp60 by the value obtained for GAPDH [2].

Determination of protein levels of the respiratory chain subunits was achieved as indicated above using 50 µg protein extracts and monoclonal antibodies specific for COXI and NDUFA9 (Mitosciences). A monoclonal antibody against β-actin (Sigma) was used as loading control.

2.4. Determination of the activity and blue native electrophoresis of the respiratory chain complexes

Enzymatic activity measurements were performed with homogenates obtained from 2×10^6 cells grown as described in Section 2.1, washed in PBS and resuspended and sonicated in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 100 U/L Heparin, 10 mM Tris–HCl, pH 7.4). The amount of protein was determined using the DC Protein Assay kit (Bio-Rad). The activities of the respiratory chain complexes I, II, III and IV and the mitochondrial mass marker citrate synthase were measured by spectrophotometric methods as previously described [16].

Blue native electrophoresis was performed as previously reported [17]. Mitochondrial protein extracts were obtained by treatment of the cells with 2 mg/ml digitonin followed by solubilization of the native complexes with 2% lauryl maltoside. Mitochondrial extracts (40 µg) were loaded on native 4–15% polyacrylamide gradient gels. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore) and probed with the specific complex I monoclonal antibody NDUFA9 (Mitosciences).

In-gel activity assays were performed as described [17]. For complex I activity assay, gels were incubated 1–2 h at 37 °C in 2 mM Tris–HCl, pH 7.4, 0.1 mg/ml NADH, and 2.5 mg/ml nitroretetrazolium blue (NTB). Stained gels were washed with distilled water and scanned.

2.5. ATP steady state levels

ATP measurements were carried out as previously described [18], with some modifications. Briefly, 2×10^5 cells were grown for 24 h in glu/gal medium in 35 mm dishes to approximately 80% confluence and then incubated for 2.5 h in a solution (156 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, pH 7.35) containing a combination of substrates and inhibitors: 5 mM 2-deoxy-D-glucose/1 mM pyruvate (for oxidative ATP) and 2-deoxy-D-glucose/pyruvate/oligomycin (for residual ATP). After incubation, cells were washed with PBS and lysed with 1 ml of boiling 100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7.75. Lysates were collected and incubated for 2 min at 100 °C, centrifuged 10 min at 13,000× g and 4 °C and supernatants frozen. ATP measurement was carried out with an Optocomp I luminometer (MGM instruments

Inc), using the ATP bioluminescence assay kit CLS II (Roche Applied Science) according to manufacturer's instructions. ATP levels were calculated with a standard ATP/luminescence curve and normalized by the total amount of protein measured with the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Assays were performed by duplicate in four independent experiments.

2.6. Measurement of ROS generation

The production of cytoplasmic and mitochondrial ROS was assessed using dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCH₂F-DA, Molecular Probes) and MitoSOX™ red (Invitrogen), respectively.

For DCH₂F-DA assays, cells (1×10^6) were grown for 48 h in "glucose/galactose medium" (DMEM plus 5% fetal bovine serum, 2 g/l glucose, 2.5 g/l galactose, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). Cells were collected, washed in PBS and counted. Approximately 5×10^5 cells were incubated in the absence or presence of 10 µM 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCH₂F-DA, Molecular Probes) in PBS, at 37 °C for 30 min in the dark. After incubation, cells were washed, resuspended in 0.5 ml PBS, and immediately analyzed with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Mean fluorescence intensity was determined with CellQuest software (Becton Dickinson).

For measurement of mitochondrial ROS, 0.75×10^5 cells were grown in glu/gal medium. After addition of 5 µM MitoSOX™ red and incubation at 37 °C for 30 min in the dark, cells were collected in 0.5 ml glu/gal medium and immediately analyzed with a FC500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter). Forward and side scatter were used to gate the viable population of cells, and mean fluorescence intensity was determined with MXP software (Beckman Coulter). Experiments were performed by triplicate in three independent experiments.

3. Results and discussion

3.1. Tumorigenic behavior of the cell lines

We tested the tumorigenic capacities of the cell lines by transplantation in nude mice. The kinetics of tumor growth and the tumorigenic properties of the cell lines are shown in Fig. 1. As can be seen, MCA3D cells were nontumorigenic. In contrast, PB cells induced tumors in about 67% of injection sites that required relatively long latency periods. A5 and CarC cell lines, on the other hand, were highly tumorigenic inducing tumors at all injection sites with short latency periods and similar kinetics of tumor growth, although CarC tumors appeared earlier (Fig. 1A, B). Tumors induced by PB were histologically typed as moderately to well-differentiated SCCs [9], whereas those induced by A5 and CarC were highly undifferentiated spindle cell carcinomas [10,11,14].

3.2. Mitochondrial function and tumorigenicity: BEC index and OXPHOS activity

Cuezva and collaborators defined the BEC index (β -F1-ATPase/GADPH protein ratio) as a bioenergetic mitochondrial index relative to the cellular glycolytic potential [2]. In patients with lung adenocarcinomas, a reduced BEC index correlated with worse prognosis [19]. In order to ascertain whether similar alterations of this bioenergetics signature occurred in our experimental model, we determined BEC index values for MCA3D, PB, A5 and CarC cell lines. As shown in Fig. 2A, a clear decrease in the BEC index, ranging from 1.93 in nontumorigenic MCA3D to 0.53 in highly malignant CarC cells, was detected associated with enhanced tumorigenicity. To determine whether this reduction was due to an impaired OXPHOS function, the activity of the respiratory chain complexes was

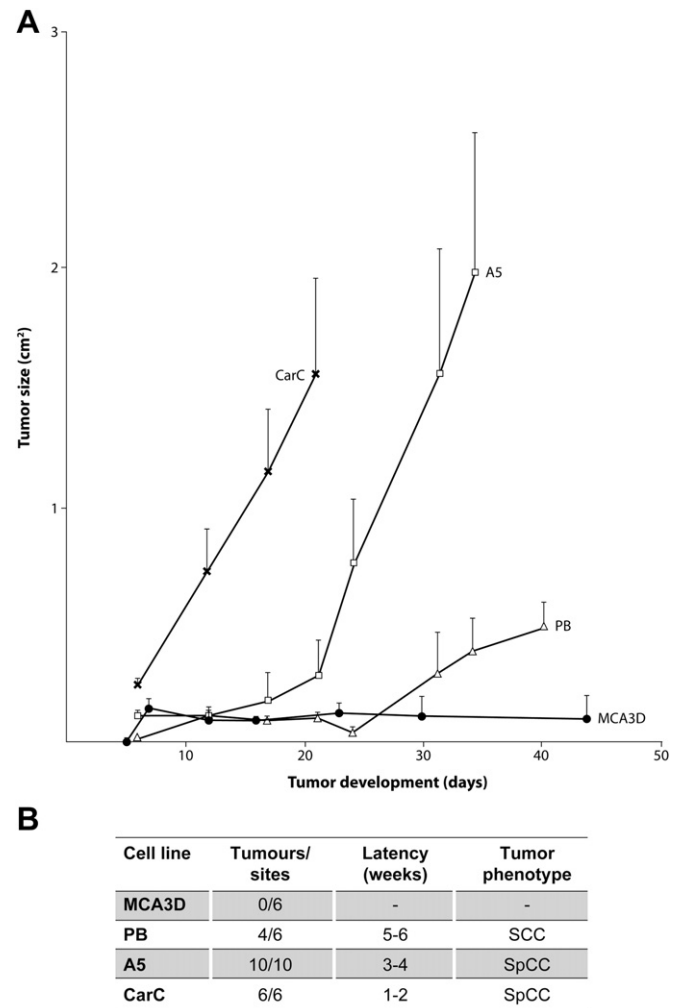


Fig. 1. Tumorigenic characteristics of the cell lines. Cells were injected into the two flanks of nude mice and the size of tumors was measured every 2–3 days as indicated in Materials and methods. (A) Kinetics of tumor growth. The average values (\pm SD) of tumor size are indicated (PB, $n = 4$; A5, $n = 10$; CarC, $n = 6$). (B) Incidence of tumors induced by the cell lines. The table records the number of tumors developed (higher than 0.5 cm²) per total number of injection sites. MCA3D cells gave rise to small cysts below 0.5 cm² that regressed or remained stable at the end of the experiment (40 days postinjection). The latency period was estimated as the time needed for tumors to reach a size of 0.5 cm². SCC, squamous cell carcinoma; SpCC, spindle cell carcinoma.

measured in the different cell lines by spectrophotometric assays, as indicated in Materials and methods. No significant differences were found in the activities of the OXPHOS complexes (data not shown). The activity of the complexes was also measured using in-gel activity assays. The activity of complex I together with the levels of fully assembled complex observed in blue native gels are shown in Fig. 2B. Also, the expression of proteins markers for complexes I and IV, as determined by Western blotting, is shown in Fig. 2C. No significant differences in these parameters were found between the different cell lines, in accordance with the spectrophotometric analysis.

The gradual decline in the BEC signature associated with enhanced tumorigenicity observed in our cell lines is in line with the proposal of reduced BEC index as a bad prognostic factor in assessing clinical outcome for cancer patients [2,19]. Apparently, this decrease is not caused by significant changes in the protein composition or activity of the mitochondrial respiratory chain complexes.

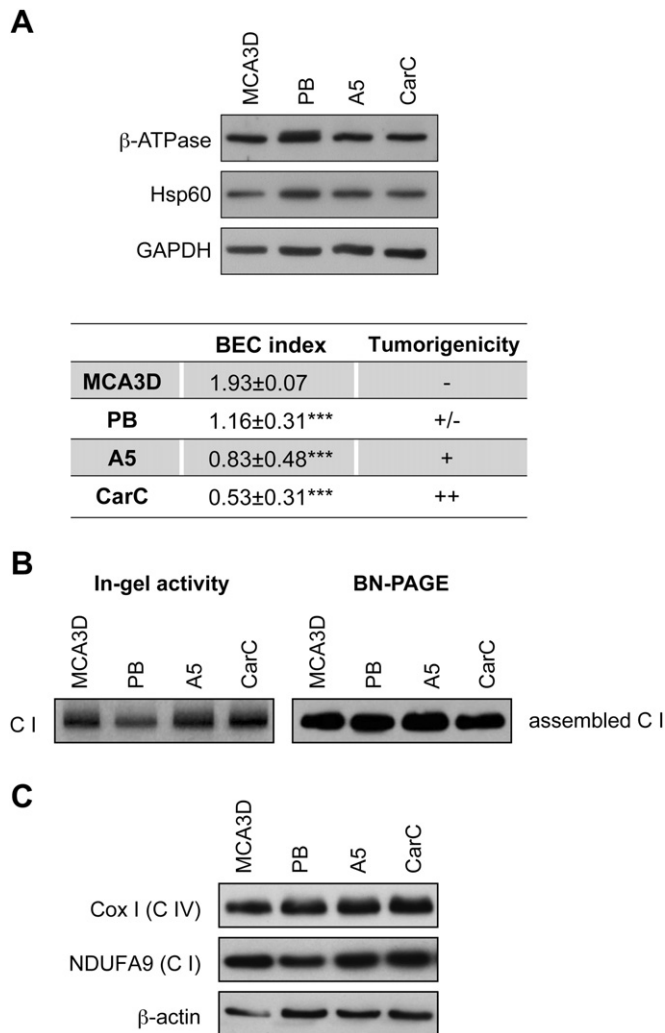


Fig. 2. BEC index decreases with tumorigenicity. (A) The expression of β -ATPase, Hsp60 and GAPDH was determined by Western blotting. BEC indexes in the table below were calculated as shown in [Materials and methods](#) and are expressed as the average (\pm SD) values obtained from five independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student's *t*-test. Significant differences with respect to MCA3D were observed. ****p* < 0.001. (B) In-gel activity assay and blue-native electrophoresis of complex I was performed as described in [Materials and methods](#). (C) Analysis of Cox I (complex IV) and NDUFA9 (complex I) expression by Western blotting. β -Actin was used as a loading control.

3.3. Glycolysis and tumorigenicity: Gal/Glu index

Since the activity of the respiratory chain complexes appeared not to be affected in tumorigenic cell lines, the observed reduction in the BEC index could be explained by an increased glycolytic activity or by a defective mitochondrial function not observed in the measurements of the activity of the OXPHOS complexes. To test these possibilities, we measured the relative ability of the different cell lines to grow in galactose *versus* high glucose medium (Gal/Glu index). Galactose is not utilized efficiently as a glycolytic substrate; therefore only cells with a fully functional OXPHOS system grow in these conditions [20]. Cells with efficient OXPHOS grow equally well in media supplemented with either galactose or glucose.

The doubling times of MCA3D, PB, A5 and CarC cells growing in the presence of either galactose or glucose were measured and the Gal/Glu indexes calculated. We observed an increase in the Gal/Glu index, ranging from 1.12 in MCA3D to 1.67 in CarC, which correlated with the tumorigenic potential of the cell lines (Fig. 3).

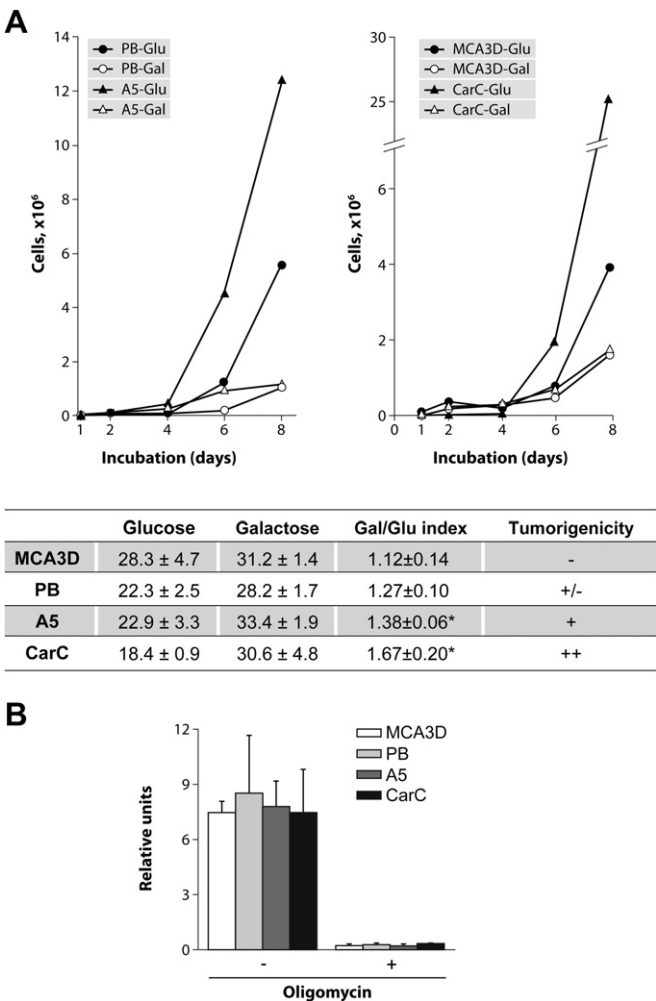


Fig. 3. (A) Gal/Glu index increases with tumorigenicity. Graphs represent the number of cells *versus* the incubation period in medium containing either glucose or galactose; a representative experiment is shown. In the table at the bottom, Gal/Glu indexes were calculated as indicated in [Materials and methods](#) and methods from the corresponding doubling times shown in hours. The data are the average (\pm SD) of duplicate determinations of 3–5 independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student's *t*-test. Significant differences with respect to MCA3D were observed in A5 and CarC. **P* < 0.02. (B) Cell lines synthesize similar oligomycin-sensitive ATP steady state levels. The ATP synthesized by the cell lines was determined in the presence of 2-deoxyglucose as described in [Materials and methods](#). The mitochondrial origin of the measured ATP was authenticated by the complete inhibition of its production with oligomycin.

Interestingly, cells grew poorly in the presence of galactose, and the observed increase in Gal/Glu index was mainly due to the most efficient growth of tumorigenic cell lines in high glucose medium.

To further investigate the OXPHOS capacity of the cells, we evaluated the ATP contents when the cells grew in 2-deoxyglucose, condition in which ATP is exclusively produced through OXPHOS (Fig. 3B). Interestingly the ATP levels were similar in all cases, thus indicating that the four cell lines can produce equivalent amounts of ATP via OXPHOS. The mitochondrial origin of ATP is clearly demonstrated with the incubation in the presence of oligomycin, an inhibitor of ATP synthase, which abolished the synthesis completely.

Taken together, the variations in BEC and Gal/Glu indexes observed in our cell model likely reflect a progressive metabolic adaptation from OXPHOS to glucose fermentation associated with increased malignancy in neoplastic cells. This metabolic change appears not to be caused by impairment of mitochondrial respiration as the capacity to synthesize ATP via OXPHOS and to grow in galactose medium are comparable in all cell lines studied.

3.4. ROS generation and tumorigenicity

Mitochondria are considered the main source of reactive oxygen species (ROS), and ROS production is generally associated with impairments of the respiratory chain [21]. Therefore, in order to ascertain whether alterations in the generation of ROS also occur associated with tumorigenicity, we measured the intracellular ROS levels in the different cell lines. A shift in the generation of ROS was found when comparing nontumorigenic MCA3D cells with tumorigenic PB, A5 and CarC cell lines (Fig. 4). Tumorigenic cell lines produced similar amounts of ROS that were higher (about threefold) than the amount of ROS generated by MCA3D. Since papilloma-derived PB is only moderately tumorigenic and spindle carcinoma cell lines A5 and CarC represent advanced stages of skin carcinogenesis [7], this finding suggests that oxidative stress increases early during tumor progression.

To learn of the intracellular source of ROS, we determined the levels of mitochondrial superoxide anion using MitoSOX, a specific

mitochondrial ROS reagent. Interestingly, the results found (Fig. S1) were similar in the different cell lines except in the case of PB that showed a very low level of superoxide, indicating that ROS production in this particular cell line mostly occurs at a site different from the mitochondria, likely the endoplasmic reticulum and/or the plasma membrane. Likewise, since the levels of mitochondrial superoxide anion of A5 and CarC are similar to that of MCA3D, the increase observed in the total ROS levels produced by the former cell lines with respect to the latter (Fig. 4) seems to be generated outside the mitochondria.

In summary, the relationship between oxidative function, glycolysis and tumorigenicity was analyzed in four epidermal cell lines representing an *in vitro* model of tumor progression, in which two indexes, BEC and Gal/Glu, were determined. In both cases, a gradual increase in glycolytic activity compared to OXPHOS function was observed associated with tumorigenicity. Notwithstanding, alterations in the expression or activity of components of the respiratory chain complexes were not found. In agreement, the corresponding

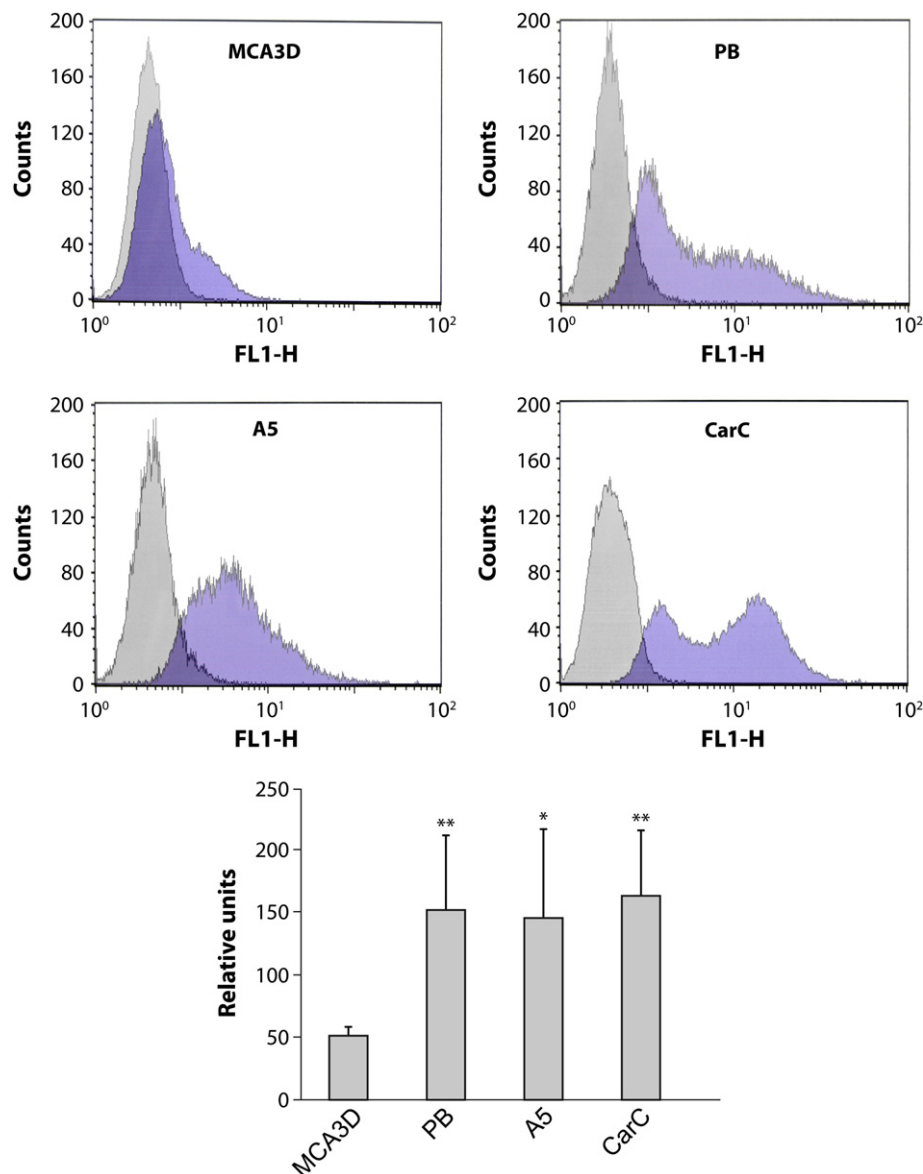


Fig. 4. Increased ROS generation is an early event in tumorigenesis. The mean fluorescence intensity of a representative experiment is shown in the absence (gray) and presence (blue) of reagent. The diagram at the bottom represents the mean values (\pm SD) of ROS levels plotted from triplicate determinations of four independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student's *t*-test. ***P* < 0.01, **P* < 0.05.

mitochondrial ATP synthetic abilities of the cell lines were similar. These results agree well with recent ideas suggesting that mitochondria are not necessarily damaged in cancer cells, but cellular metabolism is reprogrammed from mitochondrial respiration to aerobic glycolysis in order to support anabolic growth. Thus, the ATP required for growth is mainly obtained through inefficient glycolysis that otherwise generates increased levels of biosynthetic precursors necessary to sustain a high rate of cell proliferation [3–5]. The mechanisms involved in the metabolic adaptation of cancer cells are still poorly understood but they seem to be directed by alterations in proto-oncogenes and tumor suppressor genes. The cell model presented in this work represents a suitable tool to investigate the molecular mechanisms leading to the metabolic reprogramming of cancer cells.

Acknowledgments

This work was supported by grants of the Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (grants PI 07/0167 and PI 10/0703 to RG), Comunidad Autónoma de Madrid (grant number GEN-0269 to RG and grant S2010/BMD-2359, SkinModel-CM, to MQ) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant SAF2010-19152 to MQ).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.001>.

References

- [1] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein, The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.* 8 (1927) 519–530.
- [2] J.M. Cuezva, M. Krajewska, M.L. de Heredia, S. Krajewski, G. Santamaria, H. Kim, J.M. Zapata, H. Marusawa, M. Chamorro, J.C. Reed, The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression, *Cancer Res.* 62 (2002) 6674–6681.
- [3] W.H. Koppenol, P.L. Bounds, C.V. Dang, Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 325–337.
- [4] P.S. Ward, C.B. Thompson, Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate, *Cancer Cell* 21 (2012) 297–308.
- [5] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [6] E.L. Abel, J.M. Angel, K. Kiguchi, J. DiGiovanni, Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1350–1362.
- [7] R.J. Akhurst, A. Balmain, Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression, *J. Pathol.* 187 (1999) 82–90.
- [8] M. Kulesz-Martin, A.E. Kilkenny, K.A. Holbrook, V. Digernes, S.H. Yuspa, Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation, *Carcinogenesis* 4 (1983) 1367–1377.
- [9] S.H. Yuspa, D. Morgan, U. Lichti, E.F. Spangler, D. Michael, A. Kilkenny, H. Hennings, Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by an initiation-promotion protocol, *Carcinogenesis* 7 (1986) 949–958.
- [10] P.A. Burns, C.J. Kemp, J.V. Gannon, D.P. Lane, R. Bremner, A. Balmain, Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice, *Oncogene* 6 (1991) 2363–2369.
- [11] A. Buchmann, B. Ruggeri, A.J. Klein-Szanto, A. Balmain, Progression of squamous carcinoma cells to spindle carcinomas of mouse skin is associated with an imbalance of H-ras alleles on chromosome 7, *Cancer Res.* 51 (1991) 4097–4101.
- [12] M. Quintanilla, S. Haddow, D. Jonas, D. Jaffe, G.T. Bowden, A. Balmain, Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo, *Carcinogenesis* 12 (1991) 1875–1881.
- [13] S. Linardopoulos, A.J. Street, D.E. Quelle, D. Parry, G. Peters, C.J. Sherr, A. Balmain, Deletion and altered regulation of p16INK4a and p15INK4b in undifferentiated mouse skin tumors, *Cancer Res.* 55 (1995) 5168–5172.
- [14] M. Pons, J.C. Cigudosa, S. Rodriguez-Perales, J.L. Bella, C. Gonzalez, C. Gamallo, M. Quintanilla, Chromosomal instability and phenotypic plasticity during the squamous-spindle carcinoma transition: association of a specific T(14;15) with malignant progression, *Oncogene* 24 (2005) 7608–7618.
- [15] P. Peña, R. Garesse, The beta subunit of the *Drosophila melanogaster* ATP synthase: cDNA cloning, amino acid analysis and identification of the protein in adult flies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (1993) 785–791.
- [16] M. Perez-Carreras, P. Del Hoyo, M.A. Martin, J.C. Rubio, A. Martin, G. Castellano, F. Colina, J. Arenas, J.A. Solis-Herruzo, Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 38 (2003) 999–1007.
- [17] M.A. Calvaruso, J. Smeitink, L. Nijtmans, Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation, *Methods* 46 (2008) 281–287.
- [18] M. McKenzie, D. Liolitsa, N. Akinshina, M. Campanella, S. Sisodiya, I. Hargreaves, N. Nirmalanathan, M.G. Sweeney, P.M. Abou-Sleiman, N.W. Wood, M.G. Hanna, M.R. Duchen, Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 36845–36852.
- [19] J.M. Cuezva, G. Chen, A.M. Alonso, A. Isidoro, D.E. Misek, S.M. Hanash, D.G. Beer, The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis, *Carcinogenesis* 25 (2004) 1157–1163.
- [20] B.H. Robinson, Use of fibroblast and lymphoblast cultures for detection of respiratory chain defects, *Methods Enzymol.* 264 (1996) 454–464.
- [21] M. Rigoulet, E.D. Yoboue, A. Devin, Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H₂O₂ signaling, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (2011) 459–468.

3.3 CAPÍTULO 3

Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations.

Alberto Cruz-Bermúdez, Carmen G. Vallejo, Ramiro J. Vicente-Blanco, María Esther Gallardo, Miguel Ángel Fernández-Moreno, Miguel Quintanilla, and Rafael Garesse.

Resumen capítulo 3:

A pesar de que el proceso de reprogramación metabólica se pueda realizar sin afectación mitocondrial, la presencia de mutaciones en el ADNmt es un evento común en diferentes tipos de tumores, siendo la relevancia de éstas en la biología del tumor una pregunta sin resolver.

En este trabajo se demuestra la importancia del ADNmt en la tumorigenicidad. Mediante el sistema de híbridos transmitocondriales, se comparó el efecto de la ausencia de ADNmt con la presencia de diferentes ADNmt en la capacidad tumorigénica de la línea de osteosarcoma 143B.

Mediante el uso de xenografts en ratones inmunodeprimidos y el análisis de los híbridos mediante técnicas bioquímicas y moleculares se estudió un amplio panel de híbridos portadores de mutaciones con diferente grado de patogenicidad, desde controles de diferentes haplogrupos, pasando por diferentes mutaciones LHON, hasta la mutación severa m.8363G>A causante de MERFF.

Los estudios bioquímicos de la función mitocondrial sobre las diferentes líneas indicaron una afectación leve para la línea parental 143B y una afectación severa para la mutación causante de MERRF (m.8363G>A) así como para la línea 143B p0 carente de ADNmt, comparadas con células repobladas con ADNmt sin mutaciones.

La línea parental 143B posee una mutación en *MT-COI* en el ADNmt (generada probablemente durante la transformación que dio lugar al tumor del que procede). La eliminación del ADNmt de esta línea, neutraliza su capacidad de generar tumores. Curiosamente la sustitución de este ADNmt por un ADNmt sin mutaciones o con la mutación severa m.8363G>A producían el mismo efecto, sugiriendo que la presencia de mutaciones moderadas eran necesarias para mantener el fenotipo tumoral en este modelo y que la ausencia total de función mitocondrial o la presencia de una actividad mitocondrial completa es perjudicial para la tumorigenicidad.

De forma interesante, sumándose a esta tendencia natural de acumulación de mutaciones en tumores, la línea parental 143B posee una mutación en *MT-COI* en el ADNmt. Como primera aproximación, la eliminación del ADNmt de esta línea, neutraliza su capacidad de generar tumores. Curiosamente la sustitución de este ADNmt por un ADNmt sin mutaciones o con la mutación severa m.8363G>A producían el mismo efecto, sugiriendo que la presencia de mutaciones moderadas eran necesarias para mantener el fenotipo tumoral en este modelo.

Avanzando en esta teoría sobre el papel de las mutaciones moderadas en la tumorigenicidad, el uso de mutaciones LHON supone un buen ejemplo de mutaciones leves responsables de un efecto moderado en la función OXPHOS. Los estudios bioquímicos de la función mitocondrial sobre las diferentes líneas de híbridos portadoras de mutaciones LHON mostraron una afectación de leve a moderada (m.3460G>A, m.11778G>A, m.14484T>C) comparada con controles de diferentes haplogrupos (WtV, WtH, WtUk1), entre los cuales además no se encontraron diferencias significativas, siendo el efecto de los haplogrupos en este caso concreto reducido.

Los resultados, confirmaron que la capacidad tumorigénica depende de la presencia de mutaciones moderadas en el ADNmt, ya que únicamente los híbridos portadores de mutaciones LHON presentaron capacidad de generar tumores mientras que los híbridos repoblados con moléculas de ADNmt procedentes de individuos sanos reducían significativamente la tumorigenicidad de la línea parental 143B. Para una mayor confianza en los resultados obtenidos se estudiaron dos clones independientes para todas las líneas de híbridos de cada una de las mutaciones estudiadas.

Para explicar estas diferencias en la capacidad tumorigénica en función del ADNmt presente en las células, se estudiaron diferentes parámetros y rutas de señalización posiblemente alteradas por la mitocondria relacionadas con la tumorigenicidad.

Sorprendentemente, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión ni en los niveles de fosforilación de AKT y ERK, principales rutas modificadas por RAS. Así como no se encontró una correlación clara para HIF1alpha, como había sido descrito previamente.

Se encontraron diferencias en los niveles de ROS mitocondriales y citoplásmicos que correlacionaron con la capacidad tumorigénica de las líneas celulares. En la misma línea se encontró una correlación de la proteína NOX1 con la función mitocondrial y la capacidad tumorigénica así como unos niveles más altos de Histona H2A.X fosforilada para estas líneas.

Se realizaron estudios de proliferación *in vitro* y de resistencia a apoptosis, encontrándose que la ventaja que presentan estas células con respecto a las no tumorales es una mayor resistencia a apoptosis y no debido a una mayor tasa de proliferación.

En conclusión, existe una serie de rutas de señalización y parámetros pro y anti tumorigénicos, modificados por la función mitocondrial (señal retrograda mitocondrial), que se integran en el contexto celular resultando, para las líneas con una afectación moderada de la función OXPHOS, en un aumento del fenotipo tumoral. El aumento de la resistencia a apoptosis sería uno de los mecanismos principales.

El doctorando llevó a cabo la realización de las líneas de híbridos, su caracterización bioquímica y molecular y los estudios de rutas de señalización. Además participo en el diseño de los experimentos, creación de las figuras y escritura del artículo científico.

Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations

Alberto Cruz-Bermúdez^{1,2,3}, Carmen G. Vallejo¹, Ramiro J. Vicente-Blanco^{1,2}, María Esther Gallardo^{1,2,3}, Miguel Ángel Fernández-Moreno^{1,2,3}, Miguel Quintanilla^{1,4} and Rafael Garesse^{1,2,3}

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

² Departamento de Bioquímica and Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Facultad de Medicina, UAM, Madrid, Spain

³ Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

⁴ Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

Correspondence to: Miguel Quintanilla, **email:** mquintanilla@iib.uam.es

Rafael Garesse, **email:** rafael.garesse@uam.es

Keywords: cancer, mitochondria, mtDNA mutations, LHON, retrograde signaling

Received: January 14, 2015

Accepted: March 02, 2015

Published: March 30, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

To understand how mitochondria are involved in malignant transformation we have generated a collection of transmitochondrial cybrid cell lines on the same nuclear background (143B) but with mutant mitochondrial DNA (mtDNA) variants with different degrees of pathogenicity. These include the severe mutation in the tRNA^{Lys} gene, m.8363G>A, and the three milder yet prevalent Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) mutations in the *MT-ND1* (m.3460G>A), *MT-ND4* (m.11778G>A) and *MT-ND6* (m.14484T>C) mitochondrial genes. We found that 143B p⁰ cells devoid of mtDNA and cybrids harboring wild type mtDNA or that causing severe mitochondrial dysfunction do not produce tumors when injected in nude mice. By contrast cybrids containing mild mutant mtDNAs exhibit different tumorigenic capacities, depending on OXPHOS dysfunction.

The differences in tumorigenicity correlate with an enhanced resistance to apoptosis and high levels of NOX expression. However, the final capacity of the different cybrid cell lines to generate tumors is most likely a consequence of a complex array of pro-oncogenic and anti-oncogenic factors associated with mitochondrial dysfunction.

Our results demonstrate the essential role of mtDNA in tumorigenesis and explain the numerous and varied mtDNA mutations found in human tumors, most of which give rise to mild mitochondrial dysfunction.

INTRODUCTION

Cancer is a complex disease triggered by a variety of factors, including mutations in proto-oncogenes and tumor suppressor genes. As a consequence, cancer cells deregulate their cell cycle and impair apoptosis, promoting a higher proliferation rate that leads to the accumulation of a cell mass [1]. A key feature of cancer cells is their ability to reprogramme metabolism in order to adapt it to rapid

proliferation and exponential growth. This is achieved by increasing aerobic glycolysis, the well-known Warburg effect, which supplies the metabolic intermediates used in anabolic processes [2, 3]. In addition, oxidative phosphorylation (OXPHOS) is downregulated in most cancer cells, the combination of high glycolysis and low OXPHOS (the bioenergetic signature) becoming a feature used to diagnose early stages of cancer and as a marker of tumor progression [4].

The discovery of altered mitochondria in tumor tissues has stimulated studies on the relationship between mitochondria and cancer [5-7]. Accordingly, mutations in nuclear genes encoding enzymes of the Krebs cycle have been found in hereditary paragangliomas, pheochromocytomas and among other human tumors [8-10]. In addition, the recent massive sequencing of tumor and non-tumor tissues pairs performed by The Cancer Genome Atlas (TCGA) consortium identified numerous mutations in the mtDNA of cancer cells, although vast majority seems to provoke non severe dysfunctions. This suggests that mtDNA variants could drive metabolic alterations that are important in the malignant transformation, although the full pathological significance of these observations remains unclear [11-13].

In normal cells, most cellular ATP is produced in the mitochondria by the OXPHOS system, which is comprised of the electron transport chain complexes (plus two electron carriers: coenzyme Q and cytochrome c) and the multimeric ATP-synthase (complex V). OXPHOS biogenesis requires the coordinated expression of two genomes, the nuclear and mitochondrial. Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes a limited but essential number of genes for OXPHOS biogenesis, including the RNA components of the translational apparatus, two rRNAs (12S and 16S) and twenty two tRNAs, along with thirteen proteins, all of which are subunits of the I, III, IV and V complexes of the OXPHOS system. Due to their dual genetic control, OXPHOS alterations (which provoke the so-called OXPHOS diseases or mitochondrial diseases) can be caused by mutations in mitochondrial and/or nuclear DNA. The mtDNA accumulates mutations, many of them cause moderate or no phenotypic effects, while others cause severe diseases [14].

Human mitochondrial diseases are characterized by a wide variety of symptoms and they affect different organs. To date, over 250 pathogenic mutations have been identified within the human mitochondrial genome affecting genes encoding rRNAs, tRNAs and proteins. mtDNA mutations may cause multisystemic syndromes, such as in most tRNA mutations, or they may affect specific organs [14]. A paradigmatic tissue-specific mitochondrial disease is Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), caused by non-severe mutations in genes encoding complex I subunits that provoke severe visual impairment due to retinal ganglion cell death. Mutations in three polypeptides are responsible for 90-95% of all cases of LHON: *MT-ND1* (m.3460G>A), *MT-ND4* (m.11778G>A) and *MT-ND6* (m.14484T>C) [15, 16].

In addition to their role in cellular energy production, mitochondria are metabolic signaling centers that fulfil a variety of essential functions including apoptosis, ROS production and calcium homeostasis in different cells and tissues [17]. However, the fundamental molecular mechanisms underlying these processes, which

are critical to understand the role of mitochondria in health and disease, are mostly unknown. Cytoplasmic hybrids, also known as transmitochondrial cybrids or cybrids, represent models that are being used widely to study the effects of mtDNA variants on cell physiology and human pathology [18, 19]. These cells are generated by fusing mtDNA depleted cells (ρ^0 cells) with cytoplasts, typically platelets or enucleated fibroblasts [20].

The first studies into cancer involving mtDNA variants were done before the development of ρ^0 cells and therefore, they were prior to the currently available cybrid technology. In those studies, the tumorigenic properties of a cell line were modified by altering its cytoplasmic content [21, 22]. Subsequently, cybrid technology has been used to examine the relationship between mtDNA and tumorigenicity in different cell lines and for a variety of mtDNA mutations. These studies suggested different mechanisms are at play in tumor development, involving changes in ROS levels, Hif-1 α stabilization, sensitivity to apoptosis, etc., but not in a conclusive manner [23-29]. In addition, the literature is not always coherent regarding such correlations, in most cases because these analyses studied the effect of a unique mutation in reference to a unique control and in only one cybrid clone.

To clarify this controversy, in this work we have analyzed a group of parameters in at least two clones of every cell line of a wide panel of 143B osteosarcoma-derived cybrids harboring several mtDNA mutations and their corresponding controls.

Our results clearly demonstrate that mtDNA genetic variants modulate the tumorigenicity of K-RAS transformed 143B osteosarcoma cells. The mtDNAs that render a functional OXPHOS and mutant mtDNAs that severely disrupt OXPHOS all suppress tumorigenicity, as does the depletion of mitochondria in 143B ρ^0 cells. However, mtDNA mutations that impair OXPHOS but do not produce a loss-of-function all support tumorigenesis. Furthermore, in the homogeneous system of cybrid cell lines, the tumorigenic potential is directly correlated with the degree of OXPHOS impairment. This would explain the high number and variety of mtDNA mutations accumulation found in human tumors. Differences in the tumorigenic potential of 143B cybrids are correlated with resistance to apoptosis and strong NOX expression, which is most likely modulated by a complex array of pro-oncogenic and anti-oncogenic factors derived from mitochondrial dysfunction.

RESULTS AND DISCUSSION

The 143B cell line requires mtDNA to induce tumor formation

The 143B cell line, generated by transforming TE85 human osteosarcoma cells with a K-ras oncogene, has been used in numerous studies as a cancer model given its ability to efficiently form tumors in nude mice, exhibiting considerable cell motility and invasive potential [30, 31]. More than twenty years ago a 143B TK⁻ cell line was successfully used to generate a line devoid of mtDNA, the so called 143B ρ^0 cell line, which was also functionally repopulated with mitochondria from donors [20]. The parental 143B cells contain a mtDNA molecule that belongs to haplogroup X and that harbors the homoplasmic m.6267G>A mutation in the cytochrome oxidase I (COI) subunit, a mutation that impairs cytochrome c oxidase (COX) activity and respiration [32]. The m.6267G>A

mutation has been associated with different types of cancer but it has yet to be associated with mitochondrial diseases. This is probably due to its weak impact on the OXPHOS function as revealed by its slightly decrease in MIMP (Mitochondrial Inner membrane Potential), ATP levels and oxygen consumption that do not affect their ability to grow in galactose (Figure 1). As expected, there was no mitochondrial activity in these 143B ρ^0 cells.

The importance of mtDNA in the capacity of 143B cells to produce tumors was investigated by injecting 5×10^6 143B or 143B ρ^0 cells into nude mice. The 143B cells produced tumors at all injection sites within a relatively short period of 22 days (Figure 2), tumors that exhibited a high growth rate and that reached a size of 2 cm² in 42 days. By contrast, 143B ρ^0 cells were unable to generate tumors, in accordance with the non-tumorigenic nature of other ρ^0 cell lines [33] but in contrast to the proposed enhanced tumorigenicity of 143B ρ^0 cells due to their anchorage independent growth [34]. These results demonstrate that the capacity of 143B cells to produce tumors is strictly dependent on the presence of mtDNA.

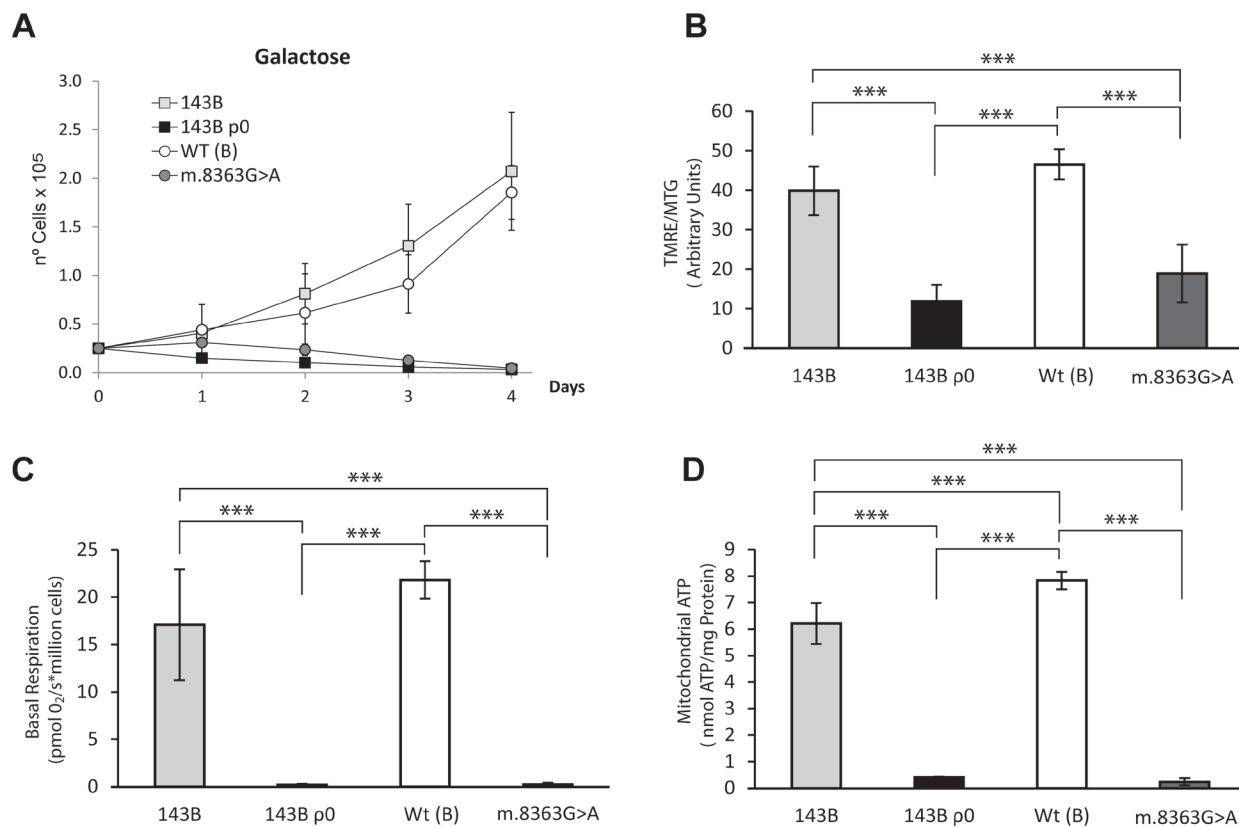


Figure 1: OXPHOS functional characterization of the different cell lines. (A) Growth curves in 0.9 g/L galactose showing severe OXPHOS dysfunction in the 143B ρ^0 and m.8363G>A cell line. (B) Mitochondrial inner membrane polarization was evaluated as the ratio of Tetramethyl rhodamine ester (TMRE) to MitoTracker Green (MTG) assessed by flow cytometry. (C) Basal respiration. Oxygen Consumption was measured using the Oroboros oxygraph-2k. (D) Steady state mitochondrial ATP. Adenosine Triphosphate (ATP) was detected using the luminometric luciferin-luciferase method in cybrid samples incubated for 2h with 5mM 2-deoxy-D-glucose/1mM pyruvate. At least three independent experiments were measured for each parameter and the data represent the means and standard deviations. The haplogorup B of wild type is in parenthesis. The mean from two independent m.8363G>A clones is also shown. The data was analyzed using one way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, and a P-value <0.05 was considered significant: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

mtDNA rendering a functional or non-functional OXPHOS system do not support tumorigenicity

To explore the possibility that mtDNA variants may modulate the tumorigenic properties of transformed cells, we investigated the tumorigenicity of cybrids harboring the well-known, severe mutation m.8363G>A. The m.8363G>A mutation in the mitochondrial tRNA^{Lys} gene severely impairs the synthesis of mitochondrial proteins, yielding a non-functional respiratory chain [18]. Like 143B ρ⁰ cells, cybrids repopulated with mtDNA harboring the m.8363G>A mutation do not respire or produce mitochondrial ATP, and they therefore die in

galactose medium (Figure 1). However, these cells are not tumorigenic (Figure 2), indicating that not only the absence of mtDNA but also a severe mtDNA mutation that fully impairs OXPHOS function acts as a tumor suppressor. Interestingly, control cybrids containing wild type mtDNA also showed weak tumorigenic behavior, inducing only small tumors at less than 20% of the injection sites, with slow growth rates and long latencies (above 63 days, Figure 2). These results suggest that the specific mtDNA in 143B cells is essential to define their tumorigenicity. Thus, mtDNAs that render either fully functional or non-functional OXPHOS systems do not support tumorigenicity, in contrast to the m.6267G>A mutation that only mildly impairs OXPHOS function.

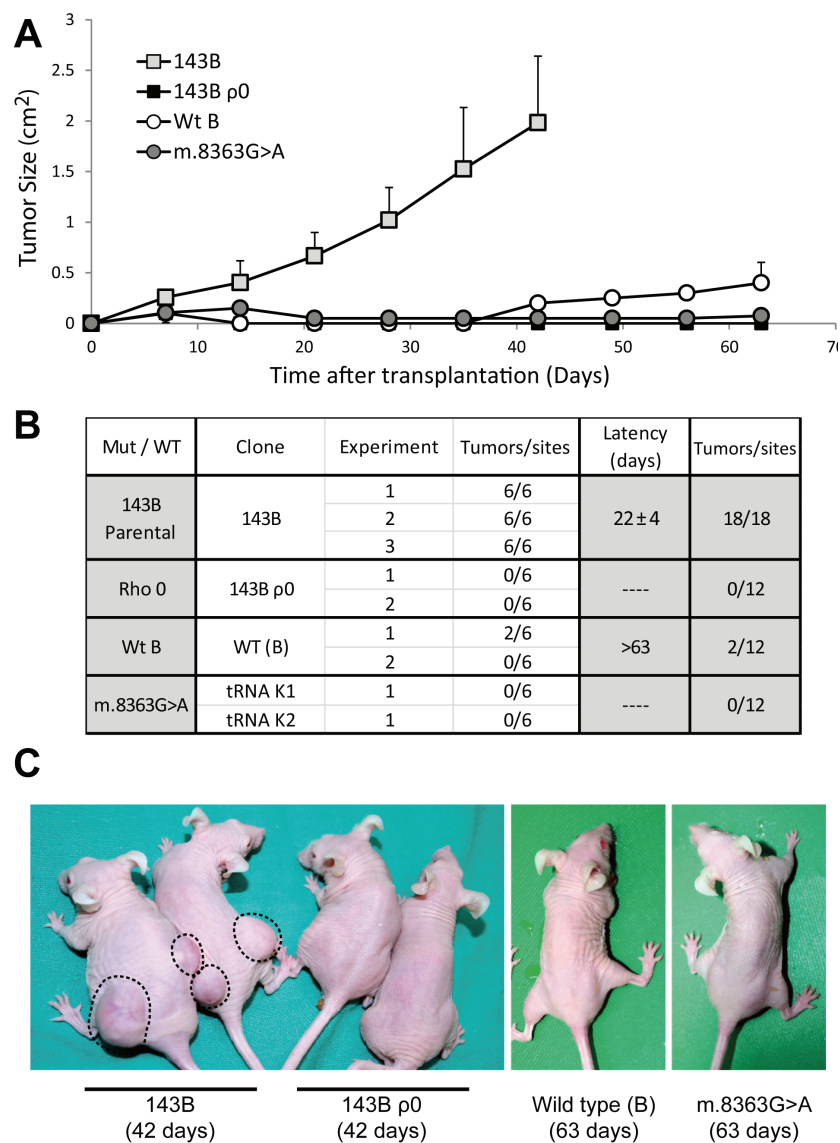


Figure 2: The 143B osteosarcoma cell line exerts its tumorigenic potential through the mild mutation m.6267G>A. (A) Tumor growth induced by injection of 5x10⁶ cells at each site, expressed as the mean for all the tumors generated by each genotype ± standard deviation. (B) Summary of the different clones and experiments carried out. The table records the number of tumors developed larger than 0.25 cm² at the end of the experiment relative to the total number of injection sites. The latency period was defined as the time needed for the tumors to reach a size of 0.75 cm². (C) Representative images of mice injected with the different cell lines. Note the difference in tumor growth in animals injected with 143B cells. The days after the injection are shown in parentheses.

mtDNA harboring mild mutations supports tumorigenicity in function of the degree of OXPHOS impairment

To investigate the relationship between mild mtDNA mutations and tumorigenicity, we generated cybrids harboring the prevalent LHON mutations and their respective control cell lines. Studies into the pathological consequences of LHON mutations show that the same homoplasmic mutation may affect some individuals (even leading to blindness) while not affecting others at all [16]. Therefore, prevalent LHON mutations are excellent examples of mild mtDNA alterations that affect OXPHOS but that do not necessarily give rise to significant phenotypic manifestations, such as the m.6267G>A.

Thus, we repopulated 143B ρ^0 cells with mtDNA harboring the well characterized mutations m.3460G>A (*MT-ND1*), m.11778G>A (*MT-ND4*) and m.14484T>C (*MT-ND6*), which belong to V, HV* and Uk1 haplogroups,

respectively as well as wild type mtDNAs for each of those haplogroups. Since the biochemical parameters and *in vitro* growth of cells harboring the different wild type versions of mtDNA (V, H and Uk1) were comparable, they were grouped in a single category (Figure 3). Compared to the wild type cells, cybrids harboring mtDNAs carrying LHON mutations showed reduced MIMP, basal respiration and mitochondrial ATP, as well as impaired growth in galactose. Thus, the functional impact of the three LHON mutations on the OXPHOS system was moderate, as reported previously [16].

Injection of nude mice with the cybrid lines demonstrated that the different mtDNA genetic variants confer variable tumorigenicity to the 143B nuclear background (Figure 4). All LHON cybrids were tumorigenic, although to a different extent. Cybrids containing the m.14484T>C mutation rapidly produced tumors at 95% of injection sites within 28 days, a behavior similar to that of the parental 143B cells (Figure 2). The tumorigenic potential of m.11778G>A cybrids was more

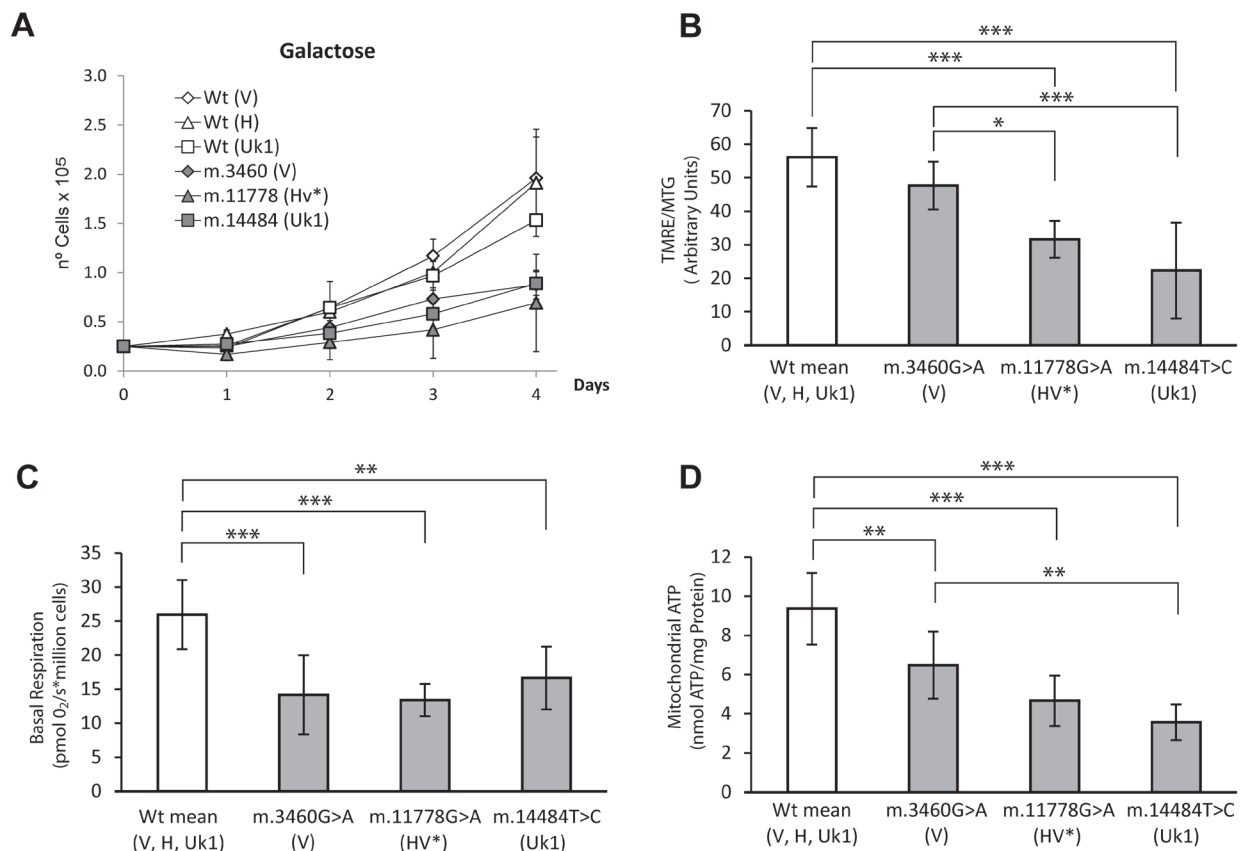


Figure 3: Functional characterization of the different LHON cybrid cell lines and their controls. (A) Growth curves in 0.9 g/L galactose (B) Mitochondrial inner membrane polarization was evaluated as the Tetramethyl rhodamine ester (TMRE) to MitoTracker Green (MTG) ratio, assessed by flow cytometry. (C) Basal respiration. Oxygen Consumption was measured using the Oroboros oxygraph-2k. (D) Steady state Mitochondrial ATP in cybrid cells. ATP was detected using the luminometric luciferin-luciferase method in cybrid samples incubated for 2h with 5mM 2-deoxy-D-glucose/1mM pyruvate. The data for cybrids harboring mtDNA mutations are the mean of two clones and the three cybrid clones harboring wild type molecules were grouped. Each clone was measured in at least three independent experiments for each parameter and the mtDNA haplogroups are showed in parentheses. The data are the means \pm standard deviation, and they were analyzed using one way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, with a P-value <0.05 considered to be significant: *= $P \leq 0.05$, **= $P \leq 0.01$, ***= $P \leq 0.001$.

moderate, inducing tumors at 67% of injection sites after about 47 days, although once formed these tumors grew very fast. Finally, there was a high incidence of tumors in cybrids harboring the m.3460G>A mutation (86% of sites) but with a long latency of 65 days and a slow growth rate. In contrast to these mutants, wild type V, H, Uk1 cybrids were weakly tumorigenic inducing small tumors at less than 40% of injection sites with a very slow growth rate and a latency above 70 days, consistent with the behavior of cybrids containing wild type mtDNA of the haplogroup B (Figure 2).

Remarkably, the tumorigenic behavior of LHON cybrids was correlated with the degree of OXPHOS dysfunction exhibited by the cell lines. Thus, the m.3460G>A mutation was associated with the lowest tumorigenicity and OXPHOS traits more similar to those of the wild types, whereas the mutation m.14484T>C had the strongest tumorigenic properties and the weakest mitochondrial function. The m.11778G>A mutation

displayed an intermediate behavior in terms of both tumorigenicity and OXPHOS function (Figures 3 and 4). These results confirm that mtDNA mutations that provoke less severe mitochondrial dysfunction are associated with stronger tumorigenicity and they suggest a correlation within a range of OXPHOS impairment. However, normal mtDNA that allows correct OXPHOS function and mutated mtDNA that provokes severe OXPHOS dysfunction both abolish tumorigenicity, acting as tumor suppressors.

Mitochondrial mediated tumorigenicity acts through multiples pathways

Although it is accepted that cancer is a multifactorial genetic disease, many studies have focused on the relationship between mitochondria and cancer in cultured tumor cells, pointing to a single parameter as that

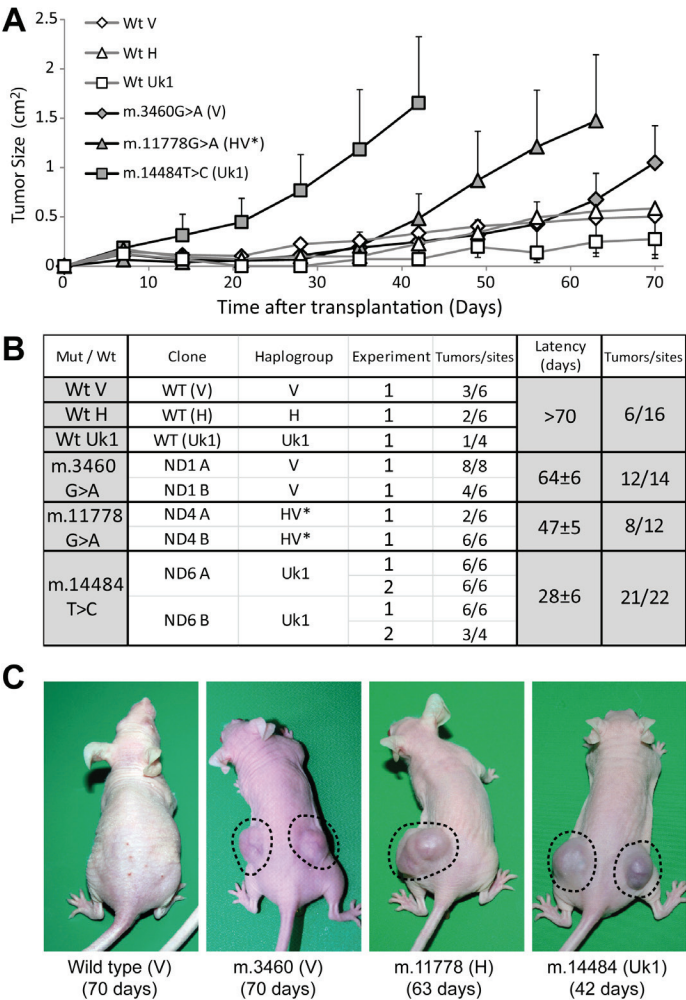


Figure 4: Mild mtDNA mutations are required for tumorigenicity. (A) Tumor growth induced upon injection of 5×10^6 cells at each site, expressed as the mean for all the tumors generated of each genotype \pm standard deviation. (B) Summary table with the different clones and experiments carried out. The table records the number of tumors developed (larger than 0.25 cm^2) relative to the total number of injection sites at the end of the experiment. The latency period was defined as the time needed for tumors to reach a size of 0.75 cm^2 . (C) Representative images of mice injected with the different cell lines, with the days after the injection indicated in parentheses.

mainly responsible for tumor formation, development and spreading. Thus, to gain a more complete vision of this process, we analyzed several pathways that may be

involved in the differences observed in the tumorigenicity of our cell lines.

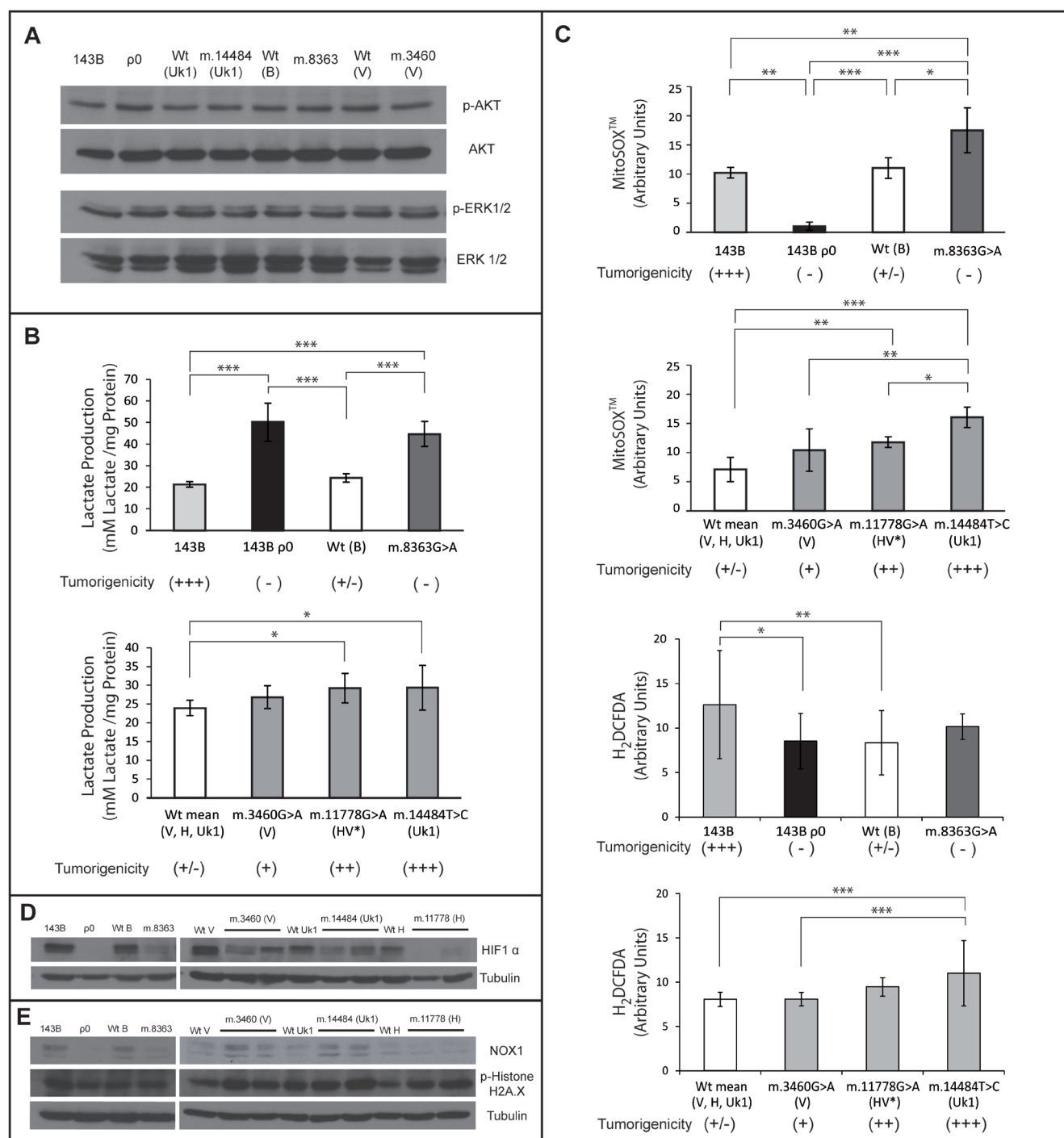


Figure 5: Mitochondrial mediated tumorigenicity acts through multiples pathways. (A) Western Blots probed for AKT, phospho-AKT, ERK and phospho-ERK 1/2. (B) Lactate levels measured in the media after 48h in culture. (C) Mitochondrial superoxide and cytoplasmic ROS levels measured by flow cytometry with the fluorescent probes mitoSOX™ and H₂DCFDA respectively. In B and (C), wild type clones for the V, H and Uk1 haplogroups were grouped. For the mutants, the bars indicate the mean of two different clones. Measurements for each clone were performed in duplicate in three independent experiments and the error bars represent the standard deviations. The data were analyzed using one way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, and a P-value <0.05 was considered significant: *= $P \leq 0.05$, **= $P \leq 0.01$, ***= $P \leq 0.001$. (D) Western Blot of HIF1α with α-tubulin used as a loading control. (E) Western Blot of NOX1 and phospho-Histone H2A.X with α-tubulin was used as a loading control.

143B cybrids do not exhibit changes in Ras signaling activity

Oncogenic Ras activates multiple signaling pathways that affect a wide variety of cellular processes that drive tumorigenesis, stimulating proliferation, suppressing apoptosis, and promoting migration and invasiveness, [35]. Since Ras signaling is constitutively activated in the parental 143B cells due to the expression of a K-ras oncogene, we investigated whether mtDNA alterations in our cybrid cell lines affected this pathway. Thus, we analyzed the levels of the phosphorylated extracellular signal regulated kinase (p-ERK1/2) and phosphorylated AKT (p-AKT), both of which are effectors of the two main pathways activated by Ras: the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathways, respectively. No changes in the expression of p-ERK1/2 and p-AKT were found in the different cybrids with respect to parental 143B cells (Figure 5A), indicating that mtDNA alterations do not modify Ras signaling activity in 143B cells. Since there is no a correlation between the activation of Ras-dependent MAPK or PI3K signaling and the tumorigenicity of the cybrid cell lines, the suppression of tumorigenicity in 143B ρ^0 , m.8363G>A, WT (B, V, H, Uk1) cybrids (Figures 2 and 4) is either independent of Ras, or it occurs downstream of p-AKT and p-ERK1/2 effectors. These results are consistent with the evidence suggesting that activated MAPK signaling in human cancers and mouse models is not always associated with tumorigenesis [36].

The glycolytic shift correlates with tumorigenicity within a range of OXPHOS function

Increased lactate production is thought to favor tumorigenesis since it is used as a carbon source by neighboring tumor cells, and it induces metabolic reprogramming and angiogenesis. On the other hand, environmental acidosis facilitates invasion by degradation of the extracellular matrix. Indeed, the levels of lactate produced by tumors are correlated with increased metastasis, tumor relapse and poor clinical outcome [37]. Lactate production is higher in our cybrid cell lines harboring mild mtDNA mutations than in the corresponding controls, which may participate in their increased tumorigenic properties (Figure 5B). However, while not tumorigenic, the 143B ρ^0 and the cell lines containing the severe m.8363G>A mutation produced more lactate, suggesting that additional dominant elements are present in these cases. It is possible that increased glycolytic flux promoted by mtDNA mutations may have a significant impact in reprogramming cancer cells. Indeed, the hypothesis that proto-oncogenes and tumor suppressors genes arose in evolution as metabolic regulators reinforce this idea [3].

Tumorigenicity induced by mild mtDNA mutations is associated with an increase in mitochondrial and cytoplasmic ROS

There are many cellular sources of reactive oxygen species (ROS) within a cell, they can be generated as an OXPHOS byproduct in the mitochondria as well as in the cytoplasm by other metabolic processes or by the NADPH oxidases in response to specific signals. The role of ROS in tumorigenesis is far from fully understood. It is accepted that tumor formation strongly depends on the amount of ROS [42], affecting (and in turn affected by) different pathways, such as those associated with NOX1 [43], ERK [44], NF- κ B [45], AKT [46, 47], HIF1 α [38] and SRC [48].

To evaluate the possible correlation between the level of ROS and the tumorigenic capacity of the cybrids we quantified the levels of mitochondrial superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) with MitoSOXTM and the levels of cytoplasmic ROS with H₂DCFDA.

The m.8363G>A tRNA^{Lys} gene mutation induces high levels of $O_2^{\cdot -}$ compared with 143B ρ^0 cells (Figure 5C), even though they share similar mitochondrial bioenergetic function (Figure 1). m.8363G>A cybrids barely synthesize 10-15% of mtDNA encoded proteins [18], probably enough to yield ROS generating subcomplexes. On the other hand, 143B ρ^0 cells, which only synthesize nuclear encoded proteins yielding complex II and a partial complex V (only lacking the two small subunits ATP6-8), are incapable of generating ROS producing subcomplexes. 143B cells containing m.6267G>A generate similar $O_2^{\cdot -}$ levels as cybrids harboring LHON mutations and more $O_2^{\cdot -}$ than control cybrids [15], yet surprisingly equivalent to the $O_2^{\cdot -}$ levels yielded by the specific control WT(B) cybrids (Figure 5C).

Cytoplasmic ROS, showed a similar behavior to mitochondrial superoxide levels. Cells harboring mild or severe mtDNA mutations showed an increase in H₂DCFDA signal compared with controls and 143B ρ^0 cells (Figure 5C).

In this cellular system, ROS levels are directly correlated with tumorigenicity unless mitochondrial function is severely diminished, such as when the m.8363G>A mutation is present, which is associated with high ROS production but not tumorigenicity. Thus, while the m.14484T>C cybrid is the strongest ROS producer and exhibited the strongest tumorigenicity, the less tumorigenic m.1178G>A and m.3460G>A cybrids produced less ROS (Figure 5C).

HIF1 α destabilization does not hamper tumorigenicity

Two hallmarks of malignant transformation are a high proliferation rate and increased resistance to hypoxic conditions [2]. Highly proliferative cancer cells in solid tumors usually outgrow their vascular network, limiting oxygen diffusion within the tumor and subjecting it to hypoxic stress. Hypoxia inducible factors (HIFs) promote

the metabolic switch towards aerobic glycolysis, neo-vascularization, tumor progression and cell invasion. Thus, HIF1 α expression and the downstream activation of a hypoxic stress response are common to many cancers, although surprisingly, HIF1 α expression is correlated with lower cancer stage or decreased patient mortality in certain cancers [38]. Thus, the relevance of HIF1 α in tumorigenesis remains controversial, with evidence that HIF1 α does not markedly affect tumorigenesis [39] or that it may fulfil a central role in this process [25]. Studies with 143B cybrids showed that severe effects on mitochondrial function decrease the stability of HIF1 α , which impairs the development of the malignant phenotype [23-25]. This is based on the regulation of HIF1 α levels by the activity of prolyl-hydroxylases (PHDs), which are in their turn regulated by the accumulation of TCA cycle intermediates (reflected in the α -ketoglutarate/succinate ratio) [8].

Our tumorigenic cybrid cell lines harboring LHON mutations exhibited lower levels of HIF1 α protein than their non-tumorigenic controls (Figure 5D). This may be due to the impaired OXPHOS function being sufficient to promote α -ketoglutarate accumulation and PHD activation. Therefore, in this cell system the levels of HIF1 α may contribute to tumorigenicity but not as a driving force. As a matter of fact, HIF1 α protein levels were also reduced in non-tumorigenic 143B ρ^0 and m.8363G>A cybrid cell lines (Figure 5D). These results are to some extent surprising given that the activity of PHDs is inhibited by mitochondrial ROS [38] and therefore, mtDNA mutants that produce higher ROS levels should have more stable HIF1 α , which is not the case. This would also indicate that OXPHOS is more important in regulating PHDs than ROS, as suggested when comparing 143B ρ^0 with m.8363G>A, where the high ROS levels produced by the latter do not rescue the low levels of HIF1 α .

Regarding the role of HIF1 α in tumorigenesis, our results are consistent with reports that HIF1 α knockdown does not affect or even increases the growth of different human carcinomas [39] (references therein). Indeed, HIF1 α may even act as a tumor suppressor, since it antagonizes MYC function [40] and it also stabilizes p53 [41].

Tumorigenicity is associated to NOX1 levels

A possible nexus between mitochondrial ROS and tumorigenicity is the induction of NADPH-oxidase 1 (NOX1) expression as a consequence of retrograde signaling [43]. Members of the NOX family generate superoxide that is rapidly converted into hydrogen peroxide, which in turn may regulate target molecules, acting as a second messenger [49]. Nox1 expression is strongly increased in breast, ovarian and colon tumors [43, 50]. Moreover, its overexpression in cultured cells has been implicated in the stimulation of proliferation [51] and angiogenesis [52], and in the inhibition of apoptosis [50]. The analysis of NOX1 expression (Figure 5E) revealed

that NOX1 expression was diminished in control cybrid cell lines and 143B ρ^0 cells with low ROS levels. On the other hand, LHON mutations that impair but do not abolish OXPHOS (increasing ROS levels) up-regulate NOX1 expression. Strikingly, NOX1 levels are reduced in cell lines with severely diminished mitochondrial function (due to the presence of the m.8363G>A point mutation). Thus, NOX1 levels are correlated with tumorigenicity.

NOX1 expression is related to superoxide levels, except in m.8363G>A cybrids in which the decrease in NOX1 expression triggered by the m.8363G>A mutation is not compensated by an increase in ROS levels (Figure 5). Hence, NOX1 expression appears not only to be regulated by ROS [43]. Therefore, the lack of NOX1 in 143B ρ^0 cells may be caused by either decreased mitochondrial ROS levels or by a deficiency in mitochondrial function.

Furthermore, the correlation between cytoplasmic and mitochondrial ROS levels could be explained at least in part by the induction of NOX1 expression by the latter: the mitochondrial ROS levels increase NOX1 expression which raises cytoplasmic ROS, suggesting a signal transduction role for NOX1.

In our model, the correlation between NOX1 and tumorigenicity may be related to its importance in maintaining K-RAS mediated transformation. Indeed, increased expression of NOX1 transcripts in colon cancer correlates with activating mutations in K-ras [50]. Moreover, Nox1 RNA interference reverts the K-RAS transformed phenotype, affecting anchorage-independent growth, morphological changes and the production of tumors in athymic mice [53]. Therefore, mild mitochondrial mutants would be more tumorigenic due to the increased NOX1 levels that support the RAS mediated transformation. Confocal microscopy studies revealed that NOX1 localizes to the mitochondria and predominantly, to the perinuclear region [43] where it can induce mutations, genomic instability and changes in the methylation of nuclear DNA in a ROS-dependent manner, favoring neoplastic transformation [54]. In this respect, NOX1 may play a significant role in signal transduction and tumorigenesis enhancing redox signaling to the nucleus.

To evaluate the putative DNA damage induced in the different cell lines, we studied the phosphorylation of histone H2A.X in western blots (Figure 5E). Phosphorylation of the Ser-139 residue in the H2A.X histone variant is an early cellular response to the induction of DNA double-strand breaks (DSBs) and this may reflect cancer-associated genomic instability [55]. H2A.X phosphorylation was stronger in mild mitochondrial mutants (LHON cybrids and parental 143B cells) and it was lower in 143B ρ^0 cells than in the controls. These results are well correlated with DNA damage and NOX1 expression, with the exception of the m.8363G>A cybrids in which H2A.X is more strongly phosphorylated relative to their low NOX1 expression. It is possible

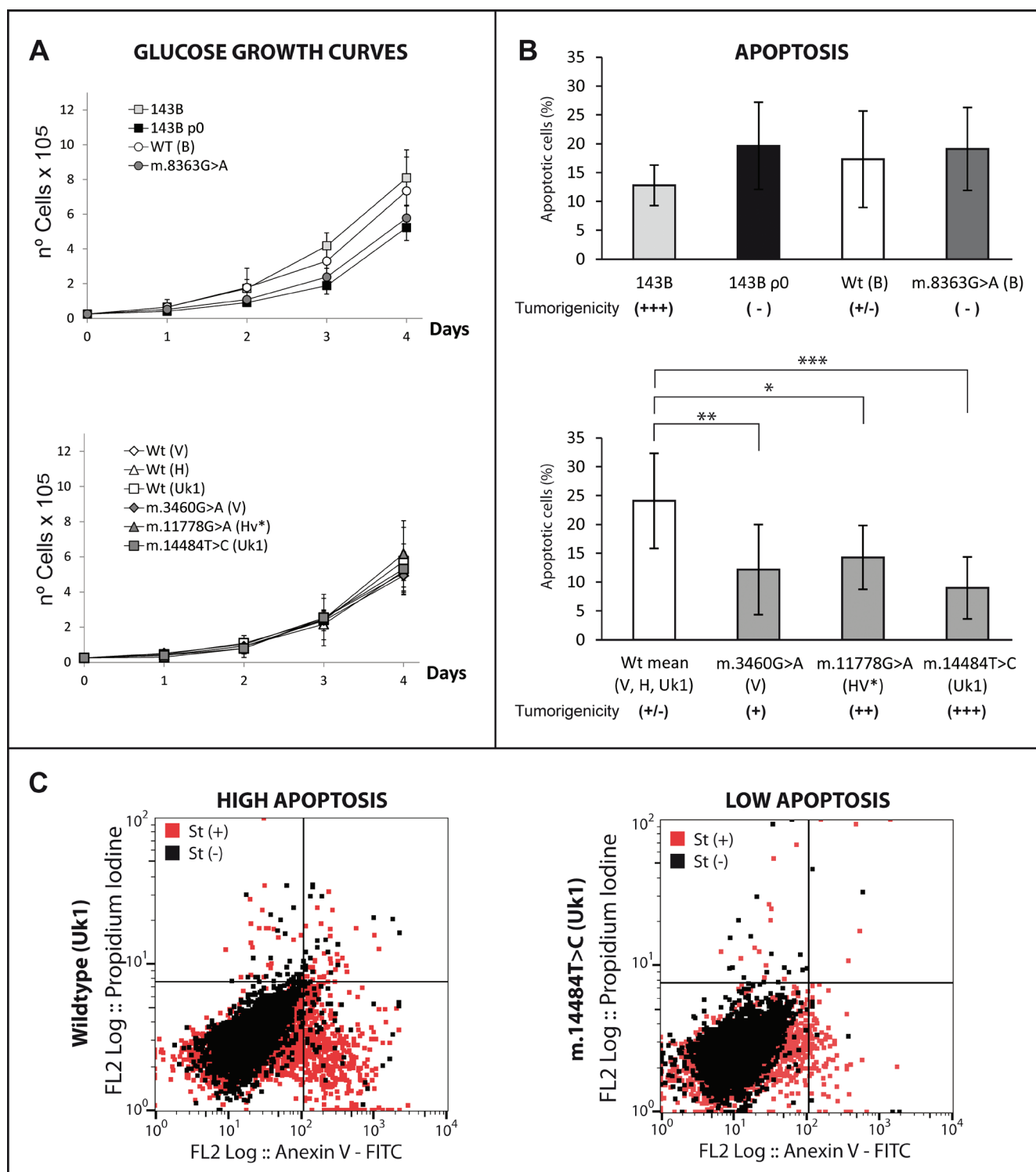


Figure 6: Mild mtDNA mutations increase apoptosis resistance. (A) Growth curves in 4.5 g/L glucose showing no relevant differences among the cell lines (B) Proportion of apoptotic cells after 24 hours in the presence of staurosporine. Wild types clones for the V, H and Uk1 haplogroups were grouped. For mutants, the bars indicate the mean of two different clones. Duplicate measurements for each clone were obtained from three independent experiments and the error bars represent the standard deviations. The data was analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, and a P-value <0.05 was considered significant: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. (C) Dot plots showing a representative assay for a wild type (high apoptosis) and for a mild mutant (low apoptosis).

that the higher levels of mitochondrial superoxide in this cell line alone are sufficient to produce DSBs. Moreover, the greater genomic damage in mutants may even be enhanced by deficient repair as a consequence of inhibiting iron-sulphur cluster production [56]. Genomic instability is a driving force for tumorigenesis in which alterations to tumor cell genomes promote the acquisition of further DNA alterations, clonal evolution and finally, tumor heterogeneity, providing a selective advantage to overcome barriers [1]. Therefore, this increased genomic damage could contribute to the tumor phenotype in the mild mutants.

mtDNA-mediated tumorigenicity correlates with resistance to apoptosis

Since tumorigenicity reflects the balance between pro- and anti-oncogenic factors, producing a high proliferation and survival phenotype, we first elucidated whether the tumorigenic potential of the cybrids correlated with their proliferative capacity. The growth curves of the cybrids in high-glucose medium were similar (Figure

6A), even though some lines had completely different tumorigenic properties (e.g., the parental 143B and WT(B) cells, Figure 2). Consequently, we hypothesized that the higher tumorigenicity of mild mutant cybrids may be derived, at least partially, from their enhanced survival. Thus, we studied the survival capacity of the cybrids after treatment with staurosporine, a well-known inducer of apoptosis in a wide range of cell lines [57]. Flow cytometry showed tumorigenic cells better resisted staurosporine-induced apoptosis (e.g., m.14484T>C, m.3460G>A and m.11778G>A) than the non-tumorigenic WT (V, H, Uk1: Figure 6B), as did 143B cells with respect to the 143 p⁰, WT(B) and m.8363G>A, although in this latter case the differences were not statistically significant. This result at least in part explains the more tumorigenic properties of the mild mutants, indicating that they would be capable of generating more tumors since they are able to better resist the more stringent conditions in the organism. The effect of mtDNA variants on the apoptotic response of the cells has been evaluated in numerous studies with varying results, ranging from mtDNA mutations protecting cells

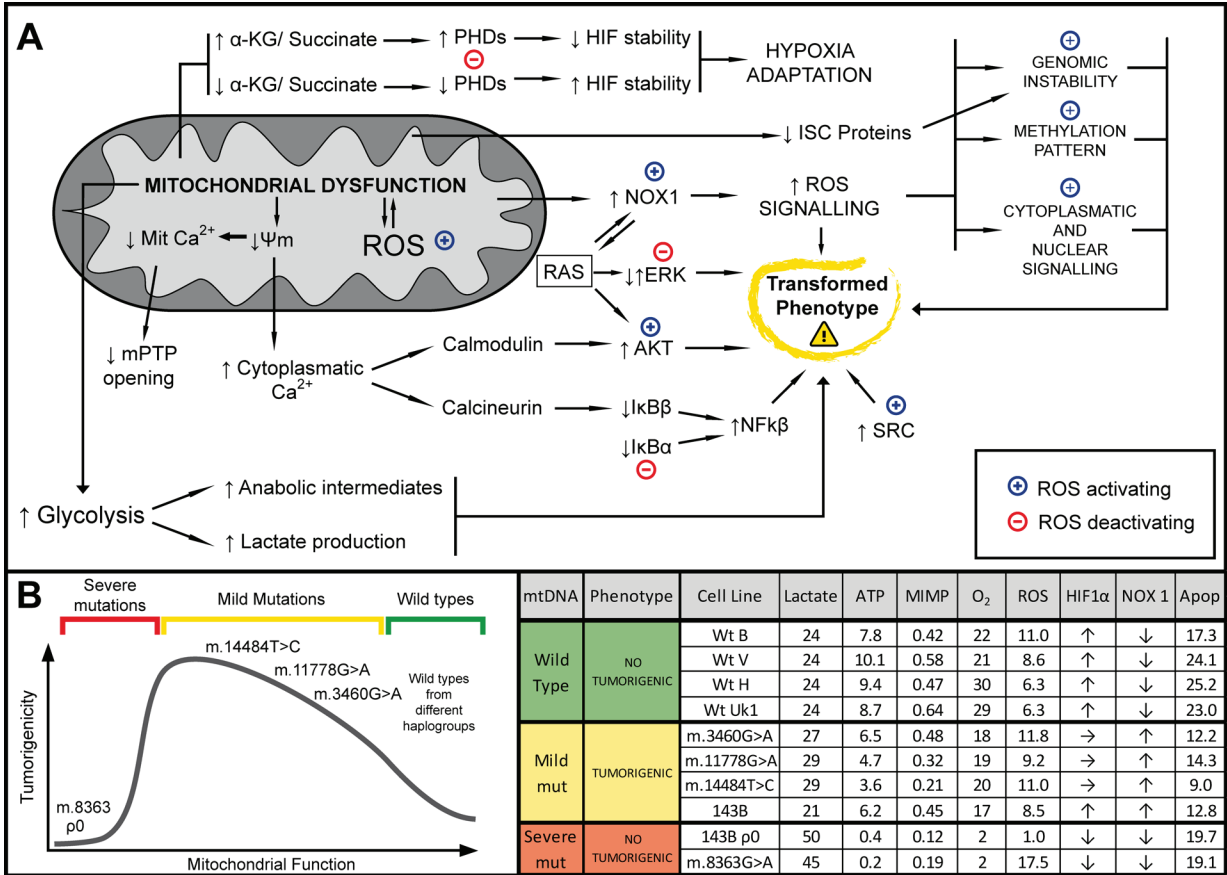


Figure 7: Summary. Mitochondrial DNA mild mutations induce tumor formation through complex retrograde signaling. (A) Schematic representation of the different pathways involved in the mitochondrial retrograde signal that may affect tumorigenic behavior described here or in the literature. We propose that small changes in OXPHOS function and ROS production trigger a complex mitochondrial retrograde response that ultimately enhances the tumorigenic phenotype: (↑) and (↓) indicate increase/activation or decrease/inhibition, respectively; (+) and (-) indicate increase/activation or decrease/inhibition mediated by ROS, respectively. (B) Relationship between mitochondrial function and tumorigenicity found in this study. (C) Table summarizing the different mitochondrial parameters measured (Data are the means and the units are shown in the results).

from apoptosis [29, 46] to the contrary [58, 59], possibly due to the different approaches employed.

One possible explanation for the enhanced resistance to apoptosis in mild mutants is related to the dependence of calcium homeostasis on MIMP (Figure 1B, 3B). Mitochondrial calcium intake essentially occurs through the mitochondrial Ca^{2+} uniporter [60]. Since Ca^{2+} is essential for PTP opening, the reduced calcium concentration in the mitochondrial matrix due to the lower MIMP in mild mutant cybrids would impair the triggering of the apoptotic response. Furthermore, the differences in resistance to apoptosis can be explained by the multiple routes modified in response to a retrograde signal that triggers a complex nuclear response. It is likely that the mechanism that confers greater resistance to apoptosis in mild mutants is not activated in 143B ρ^0 and m.8363G>A cell lines due to other pathways that exert a dominant effect over this process.

CONCLUSIONS

In this study we present convincing evidence that genetic mtDNA variants modulate the tumorigenicity of the 143B osteosarcoma cell line, strongly suggesting that mtDNA rendering a functional or non-functional OXPHOS system does not support tumorigenicity, while mild mtDNA mutations are associated with tumorigenicity. We found two parameters directed related to the tumorigenic potential of the cell lines studied in our experimental model, resistance to apoptosis and increased NOX expression. In addition, the glycolytic rate, ROS levels and Hif1 α stability also appear to be correlated with tumorigenicity, yet only within a given range (from unaffected to mildly-affected OXPHOS). Thus, tumorigenic potential probably arises as the result of a balance between several pro- and anti-tumorigenic factors that are modified as a consequence of mitochondrial dysfunction (Figure 7).

Our results suggest that the growth of tumor cells that carry mutated mtDNA that provokes only mild OXPHOS dysfunction will be favored with respect to those cells carrying either normal mtDNA or mutated mtDNA that markedly impairs OXPHOS, both of which act as tumor suppressors. This could explain the numerous and varied mtDNA mutations found in human tumors, most of which give rise to mild mitochondrial dysfunction, as well as the failure to associate a specific mtDNA mutation with a particular tumor type [12]. Any mtDNA mutation leading to mild OXPHOS dysfunction could be selected in tumors.

Our current understanding of how mitochondria influence cancer is still quite basic and much work is needed to better define this relationship. Thus, we must delve deeper into the biology of mitochondria in tumor cells and determine its relationship with the nuclear genome. To decipher the mechanisms involved in the

retrograde signals that underlie this relationship will be essential to understand what role the mitochondria play in cancer, where mtDNA could become a diagnostic and prognosis indicator of clinical relevance.

MATERIALS AND METHODS

Transmitochondrial cybrid generation and culture conditions

To homogenize nuclear and environmental factors, transmitochondrial cybrids were generated on a osteosarcoma 143B ρ^0 nuclear background by fusion with platelets, as described elsewhere [19, 20]. Written informed consent to use biological specimens for research purposes was obtained from all patients. The platelet mtDNA was first sequenced on an ABI 3710 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the variations in the mtDNA were analyzed using the Staden Package [61] to assign the samples to a mitochondrial haplogroup based on the mtDNA variations in the mitomap DB (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>). Individual clones were isolated by limiting dilution, and their mtDNA analyzed by RFLPs and sequencing.

To minimize any potential influence of the nuclear background, all cybrids generated in this work come from a single 143B ρ^0 clone, and they were isolated and analyzed biochemically, confirming the complete absence of mtDNA by quantitative PCR and in Southern blots (Cruz-Bermúdez et al., manuscript in preparation). In addition, to overcoming the potential variability in clones during cybridization [19, 62], we also analyzed at least two different clones for each cell line in all the experiments.

Cells were grown routinely at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 , and in 4.5 g/L glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ uridine and antibiotics. The cells were maintained in medium containing 2 g/L Glucose and 2.5 g/L Galactose (Glu/Gal DMEM) for 24 hours prior to performing the experiments. Each cell line was checked for mycoplasma contamination during the experiments.

Measurement of oxygen consumption

The basal respiration of intact cells was measured at 37°C in Glu/Gal DMEM by high resolution respirometry using the Oroboros oxygraph-2k, as described previously [63]. The mean of at least three independent experiments is shown.

MIMP and ROS measurements

Mitochondrial superoxide and cytoplasmic ROS were assessed using MitoSOX™ red (Invitrogen) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Invitrogen) respectively. The mitochondrial inner membrane potential (MIMP) was evaluated as the ratio of tetramethyl rhodamine ester (TMRE, Invitrogen) and MitoTracker Green (MTG, Invitrogen). For these assays, 0.75x10⁵ cells were grown in Glu/Gal DMEM. After addition of the fluorophores (5 μM MitoSOX™, 30μM H₂DCFDA or 100nM TMRE and 100nM MTG) and incubation at 37°C for 30 min in the dark, the cells were collected in Glu/Gal DMEM and analyzed immediately with a Cytomic FC500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter). Forward and side scatter were used to gate the viable population of cells, and the mean fluorescence intensity was determined with MXP software (Beckman Coulter). Experiments were performed in duplicate on at least three independent passages.

Steady state ATP

Mitochondrial steady state ATP levels were measured in cells incubated previously with 1 mM pyruvate and 5mM 2-deoxy-D-glucose, an irreversible inhibitor of glucokinase, so that cells incubated with it and Pyruvate in the absence of a carbon source synthesizes ATP only in mitochondria. ATP was quantified using the luminometric luciferin-luciferase based method, as described elsewhere [64]. Experiments were performed in duplicate on at least three independent days.

Lactic acid measurement

Lactate was measured in the medium (Glu/Gal DMEM) in which 10⁵ cells had been plated and cultured for 48 h. Proteins were removed from 50 μL of the medium by adding 100 μL of 8% Perchloric Acid and 40% EtOH at 4°C, and centrifuging at 2x10⁴ g for 10 min at 4°C. The supernatants were then frozen until the lactate in 15 μL of each sample, or lactate standard, was measured mixed with 150 μL of assay buffer (0.5M glycine [pH 9.5], 0.2M Hydrazine, 3.4mM EDTA), 100 μL of H₂O, 5μL of 1100U/mL LDH (Roche) and 30μL of 15 mM NAD⁺. NADH production was evaluated by measuring absorbance at 340nm in a multiplate reader (Synergy HT, Biotek) and it was proportional to the lactic acid concentration in the sample after a 2 h incubation. The lactate concentration was normalized to the total amount of protein measured with the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Assays were performed in triplicate in three independent experiments.

Cell growth assays

Cell growth was assayed after seeding in 6 well plates at a density of 25,000 cells/well and growing the cells for 4 days in DMEM containing either 4.5 g/L glucose or 0.9 g/L galactose as carbon source. The cells were harvested and counted every 24 hours.

Measurement of apoptosis

Apoptosis was measured by staining cells simultaneously with Annexin V-FITC (green fluorescence) and the non-vital dye propidium iodide (PI; red fluorescence), discriminating intact (Annexin V-FITC negative, PI negative), early apoptotic (Annexin V-FITC positive, PI negative), late apoptotic (Annexin V-FITC positive, PI positive) and necrotic cells (Annexin V-FITC negative, PI positive). The proportion of necrotic cells was always below 1%.

Flow cytometry analysis was carried out using the MitoStep + FITC Apoptosis Detection Kit, according to the manufacturer's instructions (Immunostep). Briefly, 7.5x10⁴ cells were seeded in Glu/Gal DMEM, apoptosis was induced by exposing them to 500nM Staurosporine for 24 hours and they were analyzed on a Cytomics FC500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter). Assays were performed in duplicate in least three independent experiments.

Western blotting

HIF1, NOX1 and phospho-Histone H2A.X expression was analyzed in cells grown in hypoxic conditions (1% O₂ for 24 h) using specific antibodies from BD Transduction Laboratories, Santa Cruz Biotechnology (sc-5281) and Cell Signaling (#9718), respectively. To analyze the phosphorylation levels of ERK1/2 and AKT, cells were deprived of serum for 12 h before lysis and the proteins were detected using specific antibodies (Cell Signaling). Tubulin immunodetection (sc-5286, Santa Cruz Biotechnology) was used as a control of protein loading. Appropriate horseradish peroxidase coupled secondary antibodies were used and peroxidase activity was assessed by enhanced chemoluminescence (Amersham).

Tumorigenicity assays

All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committees of the UAM and CSIC. Mice were house and handled following institutional guidelines for animal care and in accordance with the standards established in the "National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

For tumorigenicity assays, 5×10^6 cells were injected intradermally/subcutaneously into the two flanks of 8-week-old BALB/c female athymic nude mice (Harlan). The size of the tumors was calculated twice weekly over at least two months based on caliper measurements of two orthogonal diameters. The latency period was defined as the time needed for tumors to reach a size of 0.75 cm^2 .

Statistics

The results are presented as the mean \pm SD, and the statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. P-values ≤ 0.05 were considered significant: $*=P \leq 0.05$, $**=P \leq 0.01$, $***=P \leq 0.001$.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the "Instituto de Salud Carlos III" [PI 10/0703 and PI13/00556 to R.G and PI 04/1001 to MAFM]; "Comunidad Autónoma de Madrid" [S2010/BMD-2402 to R.G and S2010/BMD-2359 to MQ]; "Fundación Mutua Madrileña" [10.04.02.0064 to MAFM] and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant SAF2013-46183-R to MQ). M.E.G. is a staff scientist at the Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Spain. Flow cytometry analyses were carried out at the "Servicio Interdepartamental de Investigación" (SIIdI) with the excellent technical assistance of Laura Molero Martín.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest are known associated with this publication.

Abbreviations

PTP: Permeability Transition Pore; OXPHOS: Oxidative Phosphorylation; ROS: Reactive Oxygen Species; mtDNA: mitochondrial DNA; LHON: Leber's Hereditary Optic Neuropathy

REFERENCES

- Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-674.
- Vander Heiden MG, Cantley LC and Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324:1029-1033.
- Ward Patrick S and Thompson Craig B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*. 2012; 21:297-308.
- Formentini L, Martinez-Reyes I and Cuezva JM. The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB Life*. 2010; 62:554-560.
- Hoberman HD. Is There a Role for Mitochondrial Genes in Carcinogenesis? *Cancer Research*. 1975; 35:3332-3335.
- Pedersen PL, Greenawalt JW, Chan TL and Morris HP. A comparison of some ultrastructural and biochemical properties of mitochondria from Morris hepatomas 9618A, 7800, and 3924A. *Cancer Res*. 1970; 30:2620-2626.
- Warburg O, Wind F and Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*. 1927; 8:519-530.
- King A, Selak MA and Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*. 2006; 25:4675-4682.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361:1058-1066.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008; 321:1807-1812.
- Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, Davies HR, Papaemmanuil E, Gundem G, Shlien A, Bolli N, Behjati S, Tarpey PS, et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife*. 2014; 3.
- Larman TC, DePalma SR, Hadjipanayis AG, Protopopov A, Zhang J, Gabriel SB, Chin L, Seidman CE, Kucherlapati R and Seidman JG. Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:14087-14091.
- Chatterjee A, Mambo E and Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*. 2006; 25:4663-4674.
- Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW and Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol*. 2012; 226:274-286.
- Kirches E. LHON: Mitochondrial Mutations and More. *Curr Genomics*. 2011; 12:44-54.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G and Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet*. 2009; 46:145-158.
- Nunnari J and Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012; 148:1145-1159.
- Bornstein B, Mas JA, Patrono C, Fernandez-Moreno MA, Gonzalez-Vioque E, Campos Y, Carrozzo R, Martin MA, del Hoyo P, Santorelli FM, Arenas J and Garesse R. Comparative analysis of the pathogenic mechanisms

- associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. *Biochemical Journal*. 2005; 387:773-778.
19. Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G and Attardi G. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet*. 1994; 54:966-974.
 20. King MP and Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. 1989; 246:500-503.
 21. Hayashi J, Werbin H and Shay JW. Effects of normal human fibroblast mitochondrial DNA on segregation of HeLaTG Mitochondrial DNA and on tumorigenicity of HeLaTG cells. *Cancer Res*. 1986; 46(8):4001-4006.
 22. Howell AN and Sager R. Tumorigenicity and its suppression in cybrids of mouse and Chinese hamster cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75:2358-2362.
 23. Calabrese C, Iommarini L, Kurelac I, Calvaruso MA, Capristo M, Lollini PL, Nanni P, Bergamini C, Nicoletti G, Giovanni CD, Ghelli A, Giorgio V, Caratozzolo MF, et al. Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. *Cancer Metab*. 2013; 1:11.
 24. Gasparre G, Kurelac I, Capristo M, Iommarini L, Ghelli A, Ceccarelli C, Nicoletti G, Nanni P, De Giovanni C, Scotlandi K, Betts CM, Carelli V, Lollini PL, et al. A mutation threshold distinguishes the antitumorigenic effects of the mitochondrial gene MTND1, an oncojanus function. *Cancer Res*. 2011; 71:6220-6229.
 25. Iommarini L, Kurelac I, Capristo M, Calvaruso MA, Giorgio V, Bergamini C, Ghelli A, Nanni P, De Giovanni C, Carelli V, Fato R, Lollini PL, Rugolo M, et al. Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Hum Mol Genet*. 2014; 23:1453-1466.
 26. Kaipappattu BA, Ma Y, Park JH, Lee TL, Zhang Y, Yotnda P, Creighton CJ, Chan WY and Wong LJ. Crosstalk from non-cancerous mitochondria can inhibit tumor properties of metastatic cells by suppressing oncogenic pathways. *PLoS One*. 2013; 8:e61747.
 27. Park JS, Sharma LK, Li H, Xiang R, Holstein D, Wu J, Lechleiter J, Naylor SL, Deng JJ, Lu J and Bai Y. A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2009; 18:1578-1589.
 28. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF and Wallace DC. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:719-724.
 29. Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, Oda H and Ohta S. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res*. 2005; 65:1655-1663.
 30. Hensler PJ, Annab LA, Barrett JC and Pereira-Smith OM. A gene involved in control of human cellular senescence on human chromosome 1q. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:2291-2297.
 31. Luu HH, Kang Q, Park JK, Si W, Luo Q, Jiang W, Yin H, Montag AG, Simon MA, Peabody TD, Haydon RC, Rinker-Schaeffer CW and He TC. An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2005; 22:319-329.
 32. Gallardo ME, Moreno-Loshuertos R, López C, Casqueiro M, Silva J, Bonilla F, de Córdoba SR and Enríquez JA. m.6267G>A: a recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome c oxidase activity and is associated with tumors. *Human Mutation*. 2006; 27:575-582.
 33. Kaipparettu BA, Ma Y and Wong LJ. Functional effects of cancer mitochondria on energy metabolism and tumorigenesis: utility of transmitochondrial cybrids. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1201:137-146.
 34. Singh KK, Kulawiec M, Still I, Desouki MM, Geradts J and Matsui S. Inter-genomic cross talk between mitochondria and the nucleus plays an important role in tumorigenesis. *Gene*. 2005; 354:140-146.
 35. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E and Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:761-774.
 36. Deschenes-Simard X, Kottakis F, Meloche S and Ferbeyre G. ERKs in cancer: friends or foes? *Cancer Res*. 2014; 74:412-419.
 37. Doherty JR and Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest*. 2013; 123:3685-3692.
 38. Majmundar AJ, Wong WJ and Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010; 40:294-309.
 39. Franovic A, Holterman CE, Payette J and Lee S. Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:21306-21311.
 40. Gordan JD, Thompson CB and Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007; 12:108-113.
 41. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV and Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*. 1998; 392:405-408.
 42. Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Levy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B and Batteux F. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2005; 65:948-956.

43. Desouki MM, Kulawiec M, Bansal S, Das GC and Singh KK. Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biology & Therapy*. 2005; 4:1367-1373.
44. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GR and Chandel NS. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:8788-8793.
45. Morgan MJ and Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*. 2011; 21:103-115.
46. Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, Hu Y, Ramdas L, Hu L, Keating MJ, Zhang W, Plunkett W and Huang P. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol*. 2006; 175:913-923.
47. Sharma LK, Fang H, Liu J, Vartak R, Deng J and Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Hum Mol Genet*. 2011; 20:4605-4616.
48. Porporato PE, Payen VL, Perez-Escuredo J, De Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T, Dhup S, Tardy M, Vazeille T, Bouzin C, Feron O, Michiels C, Gallez B, et al. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep*. 2014; 8:754-766.
49. Kamata T. Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Sci*. 2009; 100:1382-1388.
50. Laurent E, McCoy JW, Macina RA, Liu W, Cheng G, Robine S, Papkoff J and Lambeth JD. Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras. *International Journal of Cancer*. 2008; 123:100-107.
51. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK and Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999; 401:79-82.
52. Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS and Lambeth JD. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:715-720.
53. Mitsushita J, Lambeth JD and Kamata T. The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res*. 2004; 64:3580-3585.
54. Chamulitrat W, Schmidt R, Tomakidi P, Stremmel W, Chunglok W, Kawahara T and Rokutan K. Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene*. 2003; 22:6045-6053.
55. Mah LJ, El-Osta A and Karagiannis TC. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. 2010; 24:679-686.
56. Veatch JR, McMurray MA, Nelson ZW and Gottschling DE. Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell*. 2009; 137:1247-1258.
57. Belmokhtar CA, Hillion J and Segal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*. 2001; 20:3354-3362.
58. Danielson SR, Wong A, Carelli V, Martinuzzi A, Schapira AHV and Cortopassi GA. Cells Bearing Mutations Causing Leber's Hereditary Optic Neuropathy Are Sensitized to Fas-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277:5810-5815.
59. Muyderman H, Sims NR, Tanaka M, Fuku N, Raghupathi R and Thyagarajan D. The mitochondrial T1095C mutation increases gentamicin-mediated apoptosis. *Mitochondrion*. 2012; 12:465-471.
60. Kirichok Y, Krapivinsky G and Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 2004; 427:360-364.
61. Staden R, Beal KF and Bonfield JK. The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol*. 2000; 132:115-130.
62. Hao H, Morrison LE and Moraes CT. Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Hum Mol Genet*. 1999; 8:1117-1124.
63. Echevarria L, Clemente P, Hernandez-Sierra R, Gallardo ME, Fernandez-Moreno MA and Garesse R. Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase is essential for mammalian mitochondrial translation in vivo. *Biochem J*. 2014; 460:91-101.
64. Vallejo CG, Cruz-Bermudez A, Clemente P, Hernandez-Sierra R, Garesse R and Quintanilla M. Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis. *Biochimie*. 2013; 95:1171-1176.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1 PREVIO

La visión clásica de la mitocondria como un elemento responsable fundamentalmente de la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, se ha sustituido en los últimos años por una visión más integradora, en la que no se puede entender la biología celular sin su participación en procesos clave como la regulación del metabolismo, la señalización o la supervivencia celular entre otros.

Debido a la naturaleza multienzimática del sistema OXPHOS y a su control genético dual, dos de los elementos modificadores más importantes de su función son el fondo nuclear y los haplogrupos mitocondriales. Dentro de los diferentes modelos para el estudio del sistema OXPHOS y de las mutaciones en el ADNmt se eligió el uso de los híbridos transmitocondriales ya que presentan una ventaja muy importante: el análisis de diferentes variantes del ADNmt sobre un fondo genético homogéneo. Otras virtudes del sistema son la fácil disponibilidad del material del donante (sangre), la rápida generación de las líneas celulares a partir de plaquetas de donantes y su bajo coste en el establecimiento y mantenimiento de las líneas de híbridos.

Sin embargo, el hecho de que existan diferencias específicas de tejido en la función mitocondrial y en su regulación (Kunz, 2013; Rossignol et al., 2000) hace que el fondo genético nuclear empleado en la generación de los híbridos pueda influir de un modo importante en la expresión bioquímica y molecular de los defectos asociados a las mutaciones en el ADNmt. Por otro lado, las líneas celulares utilizadas son de origen tumoral (habitualmente 143B o A549) debido a la dificultad que supone el proceso de eliminación y repoblación de ADNmt en líneas primarias. Ello dificulta la extrapolación de las conclusiones a otros tipos celulares no transformados. Nosotros decidimos utilizar la línea celular 143B ya que es la más utilizada para este tipo de estudios en la literatura y así poder comparar de una forma más fiable nuestros resultados.

En esta tesis se ha puesto especial interés en el establecimiento y control de las líneas de híbridos. Todas las líneas derivan de un único clon expandido de 143B p^0 , congelado en diferentes alícuotas a partir de las cuales se realizaron las fusiones. Además, se utilizaron controles específicos de haplogrupo, siendo en algún caso controles isogénicos (derivados de muestras en heteroplasmia y por lo tanto diferenciándose únicamente en el nucleótido de estudio del ADNmt). Por otro lado, debido a la naturaleza de esta línea celular, que como otras líneas celulares establecidas presenta habitualmente una gran variabilidad, se han utilizado un mínimo de dos clones independientes, aumentando así la fiabilidad de los resultados. Por último, durante el desarrollo de esta tesis se han puesto a punto diferentes metodologías en el laboratorio para el estudio de la función mitocondrial que, gracias a su validación con el modelo de híbridos, podrán ser utilizadas en los diferentes proyectos del grupo.

4.2 ESTUDIO DE MUTACIONES LHON

El LHON fue la primera patología descrita para mutaciones en el ADNmt hace ya casi más de 25 años (Wallace et al., 1988). Hasta la fecha, se han encontrado numerosas mutaciones asociadas a la enfermedad, justificándose el 95% de los casos con tan solo 3 mutaciones (m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C, todas en subunidades del Complejo I). A pesar de ello, sigue siendo una de las patologías mitocondriales más enigmáticas en la que prácticamente se desconocen muchos de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a las peculiaridades de la enfermedad (sesgo en el género, afectación única de las RGCs, comienzo tardío de los síntomas, portadores asintomáticos, etc.). Esto indica que es una enfermedad compleja con múltiples variables tomando parte en la generación del fenotipo final.

A pesar del número de las publicaciones existentes en la literatura, ningún grupo dedicado a la investigación de esta patología ha sido capaz de esclarecer si existe una característica común que compartan las mutaciones LHON. Una de las principales carencias de muchos de los estudios previos se debe al uso de controles procedentes de otros individuos (con diferentes fondos nucleares) o en el caso del uso de híbridos transmitocondriales el defecto viene por la comparación con controles sin la consideración de haplogrupo y/o al uso de un único clon para los estudios funcionales. Circunstancias que se han tratado de eliminar en esta tesis.

4.2.1 Actividad del Complejo I

Las mutaciones primarias LHON modifican aminoácidos conservados durante la evolución, *MT-ND1* A52T (m.3460G>A), *MT-ND4* R340H (m.11778G>A), *MT-ND6* M64V (m.14484T>C), estando éstos ausentes en la inmensa mayoría de individuos

sanos. Debido a que están localizadas en genes pertenecientes al Complejo I, sería de esperar un déficit en la actividad enzimática de este complejo, que conllevaría un defecto en la función mitocondrial. En cualquier caso, estudios previos sobre cultivos celulares del efecto de estas mutaciones han mostrado resultados contradictorios con respecto al grado de afectación (Brown et al., 2000). Como medio de ilustrar la variabilidad de los diferentes estudios se muestra la siguiente tabla, que se mantiene vigente a día de hoy (Figura 14).

Estas diferencias de afectación del Complejo I hacen todavía más complicada establecer una relación genotipo/fenotipo. En nuestro caso, gracias al uso del modelo celular de híbridos, el análisis de al menos dos clones para cada mutación, el uso de controles de haplogrupos ajustados y la homogeneidad de condiciones experimentales, hemos obtenido unos resultados que apuntan hacia una afectación similar

Table 3 Respiratory chain dysfunction in LHON			
	In vitro ⁶⁰⁻⁷⁴		In vivo ⁷⁵⁻⁷⁷
	Complex I activity*	Respiratory rate*	MRS*
G3460A	60-80%	30-35%	0%
G11778A	0-50%	30-50%	75%
T14484C	0-65%	10-20%	50%
*% decrease relative to controls.			

Figura 14: Tabla resumen extraída de (Man et al., 2002).

para las mutaciones LHON primarias así como para el inusual caso de la cohabitación de tres mutaciones LHON, cercana al 40-60% de la actividad enzimática.

Es posible que la disminución de actividad del Complejo I no sea la causa directa de la enfermedad, y esta se desarrolle, al menos en parte, a través de un conjunto de factores indirectos a la disfunción del Complejo I.

4.2.2 Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)

Cada vez son más los trabajos que apoyan la idea de un incremento del estrés oxidativo aumentado y una disminución de las defensas antioxidantes como elementos clave en la patofisiología de la enfermedad. Se ha demostrado que la producción de especies reactivas del oxígeno es mayor en híbridos portadores de cualquiera de las 3 mutaciones primarias en LHON, con una proporción disminuida de defensas antioxidantes que las hace mucho más sensibles al estrés oxidativo (Beretta et al., 2004; Carelli et al., 2002; Wong et al., 2002). La reducción dirigida de los niveles de expresión de SOD2 en el nervio óptico de ratones produjo un fenotipo similar al LHON (Qi et al., 2003). En esta dirección, la sobreexpresión de SOD2 en un modelo de ratón con déficit de Complejo I reduce el fenotipo reduciendo la apoptosis de las RGCs y la degeneración del nervio óptico, características del LHON (Qi et al., 2004). Estos trabajos apoyan el papel fundamental del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad.

En nuestros estudios mediante citometría de flujo con la sonda MitoSOX™ encontramos un aumento de los niveles de superóxido mitocondrial para las tres mutaciones primarias LHON en comparación con híbridos control. En el capítulo 1 (Triple mutación) no existen diferencias entre las mutaciones m.11778G>A y m.14484T>C. Sin embargo, en el capítulo 3 (Cruz-Bermúdez et al., 2015) sí existe un aumento asociado a la mutación m.14484T>C, lo que podría deberse a que se utilizaron clones de diferentes haplogrupos para la mutación m.11778G>A (HV* en el capítulo 3 vs J1c en el capítulo 1). Esto refuerza la posible implicación de los haplogrupos mitocondriales en el rendimiento OXPHOS, produciendo el haplogrupo J1c un aumento de la producción de ROS sobre la mutación m.11778G>A.

El estudio de ROS citoplasmáticos con la sonda H₂DCFHDA mostró una buena correlación con los niveles de superóxido mitocondriales, aunque en este caso se encontró únicamente un aumento significativo de los ROS citoplasmáticos para la mutación m.14484T>C.

Las diferencias observadas en los niveles de ROS entre híbridos controles y portadores de mutaciones LHON se deben muy probablemente a una disfunción en Complejo I y no a una disminución de la expresión de proteínas antioxidantes como se ha propuesto en otros trabajos. En nuestros experimentos, los niveles de MnSOD son mayores en los híbridos portadores de la mutación m.3460G>A comparado con sus controles isogénicos (Figura Anexo 1). Esto indicaría que el incremento observado en la producción de ROS sería aún mayor, puesto que una fracción estaría siendo detoxificada con mayor eficacia.

Como se sugiere en el capítulo 3 (Cruz-Bermúdez et al., 2015), parece existir una relación entre los niveles de NOX y los niveles de superóxido mitocondrial, siendo este papel clave para el proceso tumorigénico (Kamata, 2009). El papel de este sistema en las RGCs se desconoce, pudiendo ser un elemento fisiopatológico inducido por las mutaciones en el ADNmt, implicado en la enfermedad.

4.2.3 Potencial de membrana interna mitocondrial

El mantenimiento del MIMP es esencial para diferentes funciones mitocondriales como síntesis de ATP, síntesis de otros compuestos, apoptosis, mitofagia, dinámica mitocondrial, etc. Nuestros datos muestran una disminución del MIMP para las tres mutaciones primarias LHON, que llega a ser significativa únicamente para las mutaciones m.11778G>A y m.14484T>C. A su vez, la afectación del MIMP para estas mutaciones es similar, siendo además la cohabitación de ambas indistinguible.

La disminución del MIMP se debe probablemente a la caída en la actividad del Complejo I y al aumento de la producción de ROS, ambos fenómenos producirían un descenso en el flujo de electrones a través de toda la cadena de transporte y disminuirían por lo tanto la cantidad de protones bombeados al espacio intermembrana.

4.2.4 Niveles de ATP

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la atrofia del nervio óptico en los pacientes de LHON es una disminución de los niveles de ATP, que conduciría a la muerte de las RGCs ya que éstas son células con un alto requerimiento energético. En cualquier caso, esta teoría de forma individual no explicaría porque no hay muerte de otras células con alta demanda energética, como los fotorreceptores, otros tipos de neuronas, o el músculo cardíaco.

Las mutaciones LHON producen una disminución del bombeo de protones, que disminuye el MIMP y que, consecuentemente, reduce la síntesis de ATP mitocondrial. En nuestros híbridos se observó una disminución, en torno al 50%, de los niveles de ATP mitocondriales. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas para los niveles de ATP totales entre híbridos control y híbridos portadores de mutaciones LHON (Figura Anexo 2). Es probable que los niveles de ATP totales no estén alterados, ya que las células, a pesar de presentar un defecto mitocondrial, son capaces de compensarlo a través de una glucólisis aumentada (Baracca et al., 2005; von Kleist-Retzow et al., 2007). En cualquier caso, es probable que para otros tipos celulares no derivados de un tumor, este defecto mitocondrial no sea compensable a través de un aumento en la tasa glucolítica, produciendo un defecto global en la cantidad de ATP disponible para la célula y justificando al menos en parte la muerte de las RGCs (Wong et al., 2002).

4.2.5 Consumo de oxígeno

La etapa final de la cadena de transporte de electrones es la reducción del oxígeno a agua por la acción de la enzima Citocromo Oxidasa (Complejo IV). Una disminución de la actividad del Complejo I, con un aumento de la producción de ROS, reduciría la cantidad de electrones disponibles en la cadena para

ser utilizados en la reducción del oxígeno. Por lo tanto, la evaluación del consumo basal de oxígeno nos proporciona una información global del rendimiento de la función mitocondrial y mediante el uso de diferentes inhibidores y drogas, nos permite el estudio de los diferentes complejos del sistema OXPHOS.

Estudios previos en LHON mostraban una afectación variable entre las diferentes mutaciones primarias (Baracca et al., 2005). Nuestros resultados muestran, en concordancia con el resto de parámetros mitocondriales, una disminución similar del consumo de oxígeno para los híbridos portadores de las 3 mutaciones LHON. Las diferencias observadas entre los capítulos 1 y 3 en la disminución de consumo de oxígeno, pueden deberse al uso de diferentes aparatos de medida. En el capítulo 1 se utilizó un electrodo de Clark convencional (Hansatech Instruments), con una menor sensibilidad, y en el capítulo 3 se utilizó un oxígrafo de alta resolución (Oroboros instruments) lo cual podría explicar las mayores diferencias observadas con los controles en el capítulo 3 que en el capítulo 1.

4.2.6 Calcio en LHON

Un posible mecanismo que trata de explicar algunos aspectos de las neuropatías mitocondriales es el papel de la mitocondria en la regulación de la homeostasis del calcio. La función principal de las neuronas, la transmisión de señales, se basa en una adecuada dinámica de los iones calcio a través de las membranas y en un sistema de liberación y recuperación de neurotransmisores, requiriendo ambos procesos un alto gasto energético. Por lo tanto, factores que modifiquen la homeostasis del calcio, como la función mitocondrial, tienen una gran importancia en la función neuronal (Trevelyan et al., 2010).

Está descrito que diferentes defectos OXPHOS (Brini et al., 1999; von Kleist-Retzow et al., 2007; Moudy et al., 1995), incluso defectos específicos de Complejo I (Willems et al., 2008), producen una homeostasis alterada del calcio, siendo el haplogrupo un posible elemento modificador en algunos casos (Kazuno et al., 2006, 2008). A pesar de la posible implicación de la homeostasis del calcio en LHON y del hallazgo de inclusiones de calcio en la biopsia de un paciente (Kerrison et al., 1995), no existen estudios funcionales sobre la dinámica del calcio en el sistema controlado de híbridos con mutaciones de esta enfermedad.

Siendo además la captación de Calcio por la mitocondria un proceso dependiente del MIMP y estando éste reducido en LHON, sería esperable un defecto del mismo, con unos niveles más altos en el citosol para los híbridos portadores de mutación de esta enfermedad.

Sorprendentemente, no se observaron diferencias en los niveles de calcio citoplasmáticos en reposo, (Figura Anexo 3) ni en la capacidad de la mitocondria de importar calcio del citosol, ya sea mediante liberación del retículo endoplásmico con agonistas o en células permeabilizadas y perfundidas con alta concentración de calcio (Capítulo 1). Es posible que el defecto moderado presente en LHON no sea suficiente para alterar la dinámica del calcio, al menos en híbridos derivados de la línea 143B. Aún así, este defecto podría existir en las RGCs. Serían necesarios nuevos estudios profundizando sobre este

aspecto en células neuronales con mutaciones LHON, difíciles de abordar por la dificultad de disponer de muestras.

4.2.7 Ensamblaje del Complejo I

Como se ha descrito en la introducción, las mutaciones LHON se han asociado a defectos en el ensamblaje del Complejo I aunque estos no se ven reflejados en los niveles en equilibrio del Complejo I completamente ensamblado (Pello et al., 2008).

El estudio de los niveles estacionarios de Complejo I completamente ensamblado en cíbridos portadores de la triple mutación m.11778G>A + m.14484T>C + m.11253T>C mostraron unos niveles similares a los controles de su haplogrupo H, coincidiendo con los resultados publicados para mutaciones simples LHON. Sorprendentemente, cuando se realizaron estudios de la dinámica de ensamblaje (deplecionando previamente los complejos de subunidades mitocondriales con cloranfenicol durante 48h y dejándolos recuperarse (Clemente et al., 2013)) tampoco se observaron diferencias en el patrón de ensamblaje con respecto a los controles. Este resultado contradice el defecto de ensamblaje descrito previamente (Pello et al., 2008). La posibilidad de que la combinación de las tres mutaciones estuviese rescatando el fenotipo de ensamblaje es remota, ya que para todos los parámetros moleculares analizados el defecto es similar a las mutaciones individuales.

4.2.8 Relación estructura-función en el Complejo I

Teóricamente, debido a que las distintas subunidades mitocondriales afectadas por las mutaciones LHON analizadas forman parte de regiones diferentes del Complejo I, si estas afectasen únicamente a la estructura o función limitada a su región más próxima y no al complejo entero, se deberían observar efectos diferentes en el funcionamiento del Complejo I dependiendo de la mutación.

Así, la mutación m.11778G>A, que afecta a la subunidad ND4 situada en la región distal del brazo de membrana, debería comprometer únicamente el bombeo de protones, alterándose por lo tanto el MIMP y la producción de ATP. ND6 se sitúa en la región proximal y está implicada en la región de unión de la CoQ (Patsi et al., 2008), por lo que la mutación m.14484T>C debería afectar al transporte de electrones y al bombeo de protones alterando todos los parámetros OXPHOS (producción de ROS, ATP y consumo de oxígeno). ND1 se sitúa también en el brazo de membrana y se ha relacionado con el transporte de electrones y el bombeo de protones y la unión de CoQ, (Pätsi et al., 2012; Zickermann et al., 2015), por lo que la mutación m.3460G>A debería afectar también a todos los parámetros OXPHOS.

Nuestros resultados experimentales muestran que las tres mutaciones primarias LHON afectan a todos los parámetros medidos, actividad del Complejo I (transporte de electrones del NADH a la CoQ), niveles de ATP, MIMP, ROS etc. Estos resultados van en contra de las funciones propuestas para cada subunidad pero justifica que las tres presenten el mismo desarrollo de síntomas, la neuropatía óptica. En el caso de la triple mutación, la afectación simultánea de las subunidades ND4 y ND6 no presenta un

fenotipo más severo que la presencia de las mutaciones individuales porque probablemente, como se acaba de discutir, las mutaciones LHON afectan la función del Complejo I de forma similar compartiendo un mismo mecanismo patológico. En esta situación, la presencia de cualquier mutación reduciría la capacidad del Complejo I un porcentaje y la presencia de una segunda mutación no sería capaz de afectar la ya disminuida capacidad de la enzima.

4.2.9 Masa mitocondrial y número de copias de ADNmt

Una estrategia compensatoria observada comúnmente a la disfunción mitocondrial en enfermedades mitocondriales es el aumento de la biogénesis mitocondrial, como demuestra la proliferación masiva de las mitocondrias en las fibras musculares esqueléticas en pacientes (DiMauro and Schon, 2003). De una forma similar, un aumento de la actividad citrato sintasa, medida indirecta de la masa mitocondrial, ha sido descrita en LHON (Larsson et al., 1991). Para confirmar si las mutaciones LHON pudieran ser responsables de un efecto similar en híbridos, decidimos cuantificar mediante QPCR el número de copias de ADNmt y medir la masa mitocondrial con Mitotracker Green FM mediante citometría de flujo. En nuestro caso, los niveles de masa mitocondrial estaban ligeramente aumentados, sin llegar a ser este incremento estadísticamente significativo (Figura anexo 4). Sin embargo el número de copias de mtDNA resultó ser semejante (Figura anexo 5).

Recientemente, un estudio sobre pacientes ha proporcionado un interesante avance en el estudio de las diferencias entre individuos sintomáticos y portadores sanos. En este estudio se ha encontrado que los portadores sanos presentan unos niveles significativamente más altos del número de copias del ADNmt comparados con sus familiares afectados o individuos control. Los portadores sanos mostraron una capacidad mayor para activar la biogénesis mitocondrial. Se sugiere que este aumento en la biogénesis mitocondrial en portadores sanos compensaría el efecto patogénico de las mutaciones, siendo este uno de los mecanismos principales para la variabilidad en la penetrancia del LHON (Giordano et al., 2014).

4.2.10 Apoptosis en LHON

En pacientes de LHON, la degeneración de las RGCs y por lo tanto del nervio óptico se produce sin dolor ni proceso inflamatorio por lo que actualmente se acepta que la muerte celular se produce mediante un proceso controlado de apoptosis (si bien es cierto que para algunos pacientes la pérdida de función de las RGCs es reversible (Morgia et al., 2014)). Respecto al papel de las mutaciones en el ADNmt y el proceso de apoptosis existe fuerte controversia, por un lado algunos trabajos sugieren un papel pro-apoptótico (Battisti et al., 2004; Danielson et al., 2002; Ghelli et al., 2003; Zanna et al., 2005), mientras que otros defienden un papel anti-apoptótico de las mismas (Sharma et al., 2011; Shidara et al., 2005). La diferencia en los resultados se pueden deber en algunos casos al uso de diferentes tipos celulares (Battisti et al., 2004), al mecanismo de apoptosis medido (Danielson et al., 2002) y al papel de la galactosa (Ghelli et al., 2003; Zanna et al., 2005). Nuestros resultados, muestran una mayor resistencia a la apoptosis inducida por estaurosporina en los híbridos portadores de mutaciones LHON. En cualquier caso, la mayoría de los estudios sobre el impacto de las mutaciones en

el ADNmt se ha realizado sobre líneas tumorales, siendo necesarios estudios del papel de estas sobre líneas neuronales.

4.2.11 Haplogrupos

La importancia de los haplogrupos en la función OXPHOS ha quedado demostrada en diferentes situaciones tanto fisiológicas (Mishmar et al., 2002; Ruiz-Pesini et al., 2004) como patológicas (Coskun et al., 2012; Gallardo et al., 2012; Ruiz-pesini et al., 2000; Soto-Hermida et al., 2014; Wang et al., 2014). De la misma forma el papel de éstos en el contexto del LHON ha sido señalado en diferentes estudios, sugiriendo que el haplogrupo Uk se relacionaba con un peor pronóstico para la mutación m.3460G>A, el haplogrupo J2 para la mutación m.11778G>A y el haplogrupo J1c para la mutación m.14484T>C (Brown et al., 1997; Hudson et al., 2007; Torroni and Petrozzi, 1997). En trabajos recientes realizados con cíbridos, se sugiere que los individuos pertenecientes a los haplogrupos Uk, J1c y J2 son más susceptibles al desarrollo de la enfermedad ya que estos presentan una función OXPHOS reducida, resultado en parte de unos niveles más bajos de ADNmt (Gómez-Durán et al., 2010, 2012). En nuestros estudios no observamos diferencias significativas entre los haplogrupos estudiados (V, H, HV*, Uk1, J1c) aunque eso no descarta que existan diferencias relevantes entre otros haplogrupos o que la combinación de éstos con determinadas mutaciones LHON participen en el desarrollo de la enfermedad como se ha indicado en trabajos previos. En este sentido, el haplogrupo J1c parece incrementar la producción de superóxido mitocondrial para la mutación m.11778G>A aunque no aumenta las diferencias con los controles para el resto de parámetros (crecimiento en galactosa, MIMP o ATP mitocondrial).

El correcto estudio de la implicación de los haplogrupos en las patologías mitocondriales mediante el modelo de cíbridos exige el análisis de varios pedigrís para cada haplogrupo y múltiples clones para cada pedigrí. Además, el proceso de coevolución entre subunidades codificadas en el núcleo y en el ADNmt (Aanen et al., 2014; Rand et al., 2004; Wolff et al., 2014) hace más complicado este tipo de estudios, ya que un determinado haplogrupo puede tener mayor o menor rendimiento OXPHOS en función de si ha coevolucionado con variantes nucleares determinadas, pudiendo llegar a conclusiones diferentes en función del fondo nuclear utilizado.

4.2.12 Factores ambientales

Entre los factores ambientales que se han asociado más habitualmente a LHON destacan el consumo de tabaco y de alcohol (Chalmers and Harding, 1996). Recientemente, se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre los síntomas y el consumo de tabaco (Portadores asintomáticos de mutaciones LHON fueron más susceptibles de desarrollar la enfermedad si eran fumadores habituales). El efecto del alcohol no llegó a ser significativo, aunque se observó una tendencia entre su consumo y la aparición de los síntomas (Kirkman et al., 2009).

El consumo de alcohol y tabaco está relacionado con un aumento del stress oxidativo (Hoek et al., 2002; Wooten et al., 2006) y con una reducción de la actividad del Complejo I (Smith et al., 1993),

curiosamente, ambos fenómenos están propuestos como posibles mecanismos de acción de las mutaciones LHON para el desarrollo de la enfermedad. Esta asociación entre tabaco, alcohol y desarrollo de los síntomas LHON reafirma la importancia del estrés oxidativo y la actividad del Complejo I como elementos clave del mecanismo de la enfermedad. Es probable que el consumo de estos tóxicos en grandes cantidades, disminuya el umbral necesario para el desarrollo de los síntomas.

4.2.13 Mecanismo de acción

Las mutaciones LHON son habitualmente homoplásmicas en sangre, con únicamente un 15% de familias heteroplásmicas, (Juvonen et al., 1997). La carga mutacional en el nervio óptico suele desconocerse por la inaccesibilidad del tejido, salvo por las contadas

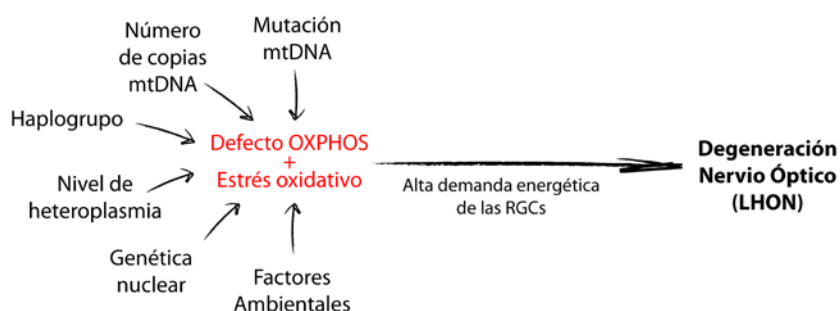


Figura 15: Mecanismo general de la Neuropatía óptica hereditaria de Leber. La afectación moderada causada por las mutaciones en el ADNmt en combinación con determinadas condiciones ambientales, factores nucleares y alta demanda energética de las RGCs conduciría a la atrofia del nervio óptico.

ocasiones en las que se dispone del tejido *post-mortem*. Existe, por lo tanto, la posibilidad de que los niveles en sangre y en el nervio óptico sean diferentes. De hecho, el análisis de muestras de autopsia de un paciente afectado con la mutación m.17778G>A demostró que los niveles de ADNmt mutado en sangre eran del 33%, mientras que en el nervio óptico y en la retina, eran del 95% y del 100% respectivamente (Howell et al., 1994). Sin embargo, niveles altos de mutación en sangre predicen niveles altos en la retina y en el nervio óptico (Juvonen et al., 1997). La causa de una posible acumulación específica de estas mutaciones en el nervio óptico con respecto a otros tejidos se desconoce. En individuos afectados los niveles de mutación en el nervio óptico suelen ser mayores que en los asintomáticos con idénticos niveles en sangre (Chalmers and Schapira, 1999; Huoponen, 2001; Mroczek-Tońska et al., 2003), así como los niveles de biogénesis mitocondrial son menores en los portadores de mutaciones que desarrollan la enfermedad (Giordano et al., 2014). En cualquier caso, estos factores no explican por sí solos la penetrancia incompleta de la enfermedad.

Considerando la exigencia energética de las RGCs y la fisiología del nervio óptico (Morgan, 2004), la hipótesis de un transporte axonal alterado debido a una función mitocondrial disminuida ha sido propuesta para esta enfermedad (Yu-Wai-Man et al., 2011). A la luz de los datos generados en esta tesis en conjunción con los datos discutidos se podría resumir la patogenia de la enfermedad de la siguiente manera (Figura 15): una disminución de la función OXPHOS y de los niveles de ATP como la descrita, incluso siendo ésta no severa, podría por un lado dificultar la motilidad de las mitocondrias en las RGCs (proceso dependiente de ATP), conduciendo a una distribución incorrecta de estas, circunstancia de especial importancia en las sinapsis por su alto requerimiento energético. Además, por otro lado las mutaciones LHON producen un aumento en la producción de ROS y daño celular, que produciría la

muerte por apoptosis de las RGCs, pérdida de los axones y finalmente atrofia del nervio óptico (Battisti et al., 2004; Levin, 2007; Yu-Wai-Man et al., 2011).

4.3 MITOCONDRIA Y CÁNCER

4.3.1 Visión global

La relación entre mitocondria, metabolismo y cáncer, fue propuesta hace casi un siglo por Warburg (Warburg et al., 1927). A pesar de ello, la categoría de este fenómeno como una característica clave del cáncer no se ha impuesto hasta los últimos años en los que se ha producido su redescubrimiento (Hanahan and Weinberg, 2011), como se puede observar si se realiza una búsqueda en

Web Of Science™ (Figura 16). Durante el desarrollo de esta tesis se ha contestado a preguntas abiertas sobre el efecto Warburg y el metabolismo tumoral como: ¿Es necesaria una disfunción mitocondrial? o ¿Cuál es el papel de las mutaciones encontradas en el ADNmt?

En el capítulo 2 (Vallejo et al., 2013), se estudió la función mitocondrial en una serie de 4 líneas celulares epiteliales, MCA3D, PB, A5 y CarC, con un potencial tumorigénico creciente. De acuerdo con el efecto Warburg se encontró un aumento de la función glucolítica comparada con la función mitocondrial que correlacionaba con la tumorigenicidad. Interesantemente, esta adaptación metabólica no es debida a una disfunción en el sistema OXPHOS, ya que los niveles de ATP mitocondrial, la cantidad de subunidades individuales y los niveles de complejos ensamblados así como sus actividades enzimáticas no disminuyeron con la progresión tumoral. Además no se encontró mayor producción de superóxido mitocondrial. Estos resultados apoyan la teoría de que la mitocondria no tiene por qué estar necesariamente afectada en las células tumorales, pero sí el metabolismo energético de estas, que es reprogramado hacia un aumento de la glucólisis aerobia para apoyar el crecimiento anabólico (Wallace, 2012).

Por otro lado, las células tumorales utilizan o modifican cualquier sistema presente en la célula en su propio beneficio, como la hipermutación somática de las células del sistema inmune (Roberts and Gordenin, 2014), el sistema de edición de ARNm APOBEC (Roberts et al., 2013), la resistencia a anoikis característica de las células sanguíneas (Frisch and Schaller, 2014) así como el uso de proteínas modificadas para el mantenimiento no condicional de la señalización celular (Weinberg et al., 2010) entre otros muchos. El efecto Warburg en sí mismo es la utilización del metabolismo propio de células proliferativas sanas para mantener un metabolismo dirigido hacia el crecimiento celular. Por lo tanto, no es de extrañar que la aparición de mutaciones en el ADNmt que generan un descenso moderado de la



Figura 16: Redescubrimiento del efecto Warburg. Publicaciones (en verde) y número de citas (morado) a lo largo de los años.

función OXPHOS, proceso natural durante el envejecimiento (Itsara et al., 2014; Trifunovic et al., 2004), sea un mecanismo más del que se beneficien las células durante la tumorigenesis.

La presencia de una mayor frecuencia de estas mutaciones en tejidos tumorales sugiere la importancia de las mismas. Nuestros resultados apuntan claramente en esta dirección, produciéndose un beneficio para las células tumorales cuando éstas presentan mutaciones en el ADNmt que afectan de forma moderada a la función OXPHOS. Para investigar si este efecto se producía además en pacientes reanalizamos *in silico* los datos generados por The Cancer Genome Atlas (Ju et al., 2014). Evaluando el impacto de las mutaciones que producían cambio de aminoácido generadas *de novo* en el tumor, es decir, que no están presentes en tejidos sanos, se observa una sobrerrepresentación de mutaciones que producen un efecto teórico similar a las mutaciones LHON (medio-alto según el algoritmo de <http://mutationassessor.org/>). Estos datos validan de alguna forma los resultados obtenidos en esta tesis para el aumento de la tumorigenicidad por mutaciones en el ADNmt de un impacto moderado (Figura 17).

En cualquier caso, es necesario un estudio más profundo de las bases de datos generadas durante los últimos años, teniendo en cuenta el tipo de tumor, las mutaciones “driver” etc.

Debido a la propia naturaleza de la genética mitocondrial, las mutaciones en el ADNmt tienen un sistema adicional para la regulación de su función, el nivel de heteroplasma en la célula. Así, es posible que mutaciones severas (que cuando están presentes en homoplasma impiden el crecimiento tumoral) cuando se presentan en un determinado nivel de heteroplasma produzcan un efecto similar a mutaciones moderadas en homoplasma, favoreciendo el crecimiento de los tumores (Park et al., 2009). Por lo tanto, más allá de las mutaciones presentes, existe la posibilidad de que los niveles de las mutaciones varíen a lo largo del proceso de progresión tumoral o incluso dentro de la heterogeneidad del tumor en función de las necesidades del mismo. Recientemente incluso se ha descrito la capacidad de transmisión horizontal de moléculas de ADNmt en líneas tumorales *in vivo*, abriendo aún más el abanico de posibilidades que éstas disponen (Tan et al., 2015).

Por otro lado, sería muy interesante realizar estudios epidemiológicos sobre una posible incidencia mayor de cáncer en pacientes de LHON, o en términos más generales de patologías mitocondriales no severas.

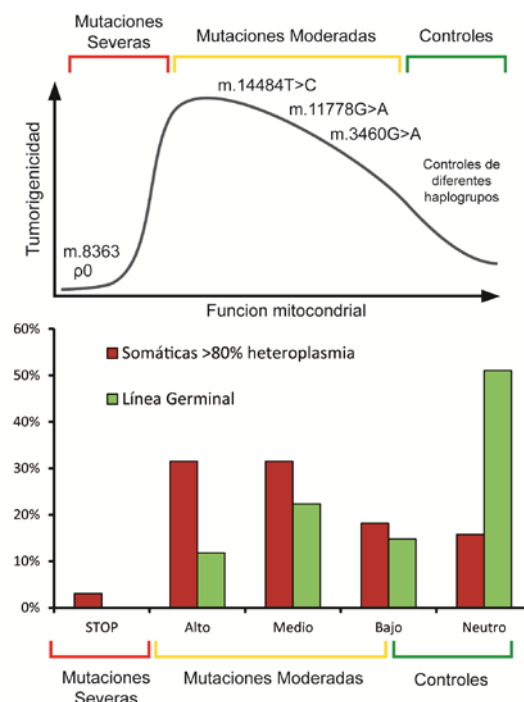


Figura 17: Importancia de las mutaciones moderadas del mtDNA en cáncer. (Panel superior) relación propuesta entre patogenicidad de mutaciones en el ADN mitocondrial y tumorigenicidad en modelos celulares *in vitro*. (Panel inferior) frecuencia de las mutaciones en el ADNmt en tumores humanos o en la línea germinal en función de su patogenicidad estimada *in silico*. Datos obtenidos de (Ju et al., 2014)

4.3.2 Estudios de tumorigenicidad con líneas de cíbridos

Una de las conclusiones importantes de este trabajo, es que un cierto nivel de función OXPHOS es esencial para la tumorigenicidad de las líneas celulares. De esta forma, la ausencia de ADNmt o la presencia de mutaciones que producen un defecto severo conllevan una pérdida completa de la capacidad tumorigénica. Trabajos con otras líneas celulares deplecionadas para su ADNmt (Hayashi et al., 1992; Kaiparettu et al., 2010) o con cíbridos portadores de otras mutaciones severas (Calabrese et al., 2013; Gasparre et al., 2011; Iommarini et al., 2014; Park et al., 2009) arrojan resultados similares en este aspecto.

En un reciente estudio, la importancia de mantener cierta función OXPHOS para la progresión tumoral ha quedado demostrada de una forma sorprendente (Maiuri and Kroemer, 2015; Tan et al., 2015). En este estudio mostraron que, aún con tiempos mayores de latencia, líneas ρ^0 eran capaces de generar tumores gracias a que adquirían ADNmt de las células del huésped. Más aun, observaron una recuperación progresiva de la función OXPHOS a lo largo del proceso de progresión tumoral desde el tumor primario hasta los tumores metastásicos en el pulmón.

Es probable que las células requieran una cierta función mitocondrial, ya que ésta es esencial para procesos celulares básicos y en concreto para las células proliferativas es necesaria una correcta síntesis de metabolitos (Ahn and Metallo, 2015), siendo el capítulo 2 (Vallejo et al., 2013) un buen ejemplo de la persistencia de la función mitocondrial durante la progresión tumoral.

En cuanto al papel de las mutaciones en el ADNmt con un efecto moderado y su capacidad de modular la tumorigenicidad de líneas de cíbridos existe bastante controversia. En un trabajo pionero, Hayashi y col. demostraron que la tumorigenicidad de las células HeLa dependía de la presencia de ADNmt, pero que la modulación del fenotipo no se veía afectada por mutaciones en el ADNmt (Hayashi et al., 1992).

Cíbridos sobre la línea de cáncer de próstata PC3 portadores de la mutación m.8993T>G en el gen *MT-ATP6*, producen más ROS y generan tumores más eficientemente que los cíbridos portadores de moléculas control (Petros et al., 2005). De forma similar, las mutaciones m.8993T>C y m.9176T>C en el mismo gen, han demostrado ser críticas para la capacidad de generar tumores en líneas de cíbridos HeLa (Shidara et al., 2005).

Estudios utilizando cíbridos 143B portadores de una mutación severa para el gen *MT-ND5* con diferentes niveles de heteroplasmia (72% o 100% de copias mutadas) mostraron profundas diferencias en sus capacidades tumorigénicas. Siendo los cíbridos portadores de la mutación en homoplasmia menos tumorigénicos, indicando que una afectación severa de la función mitocondrial dificultaría la formación de tumores (Park et al., 2009). Estudios posteriores sobre el fondo nuclear 143B, demostraron que la transferencia de mitocondrias de la línea epitelial de mama no tumoral MCF10A o de la moderadamente metastásica MDAMB-468 de cáncer de mama, revertían las propiedades tumorales de la línea parental 143B. Indicando que mitocondrias benignas podían revertir las diferentes propiedades tumorales de la línea 143B (Kaiparettu et al., 2013).

Por el contrario, resultados recientemente publicados parecen indicar que las mutaciones con un efecto moderado no aumentan el potencial tumorigénico, encontrando sólo un potencial disminuido cuando la función mitocondrial está profundamente afectada (Iommarini et al., 2014). Estos resultados son consistentes con estudios previos de este grupo, en los cuales la función mitocondrial es necesaria para permitir la reprogramación metabólica mediada por HIF1 α y el consecuente comportamiento tumoral (Calabrese et al., 2013; Gasparre et al., 2011).

Estos estudios sugieren diferentes mecanismos en juego, incluyendo cambios en los niveles de ROS, estabilización de HIF1 α , resistencia a apoptosis, etc., pero no de una forma concluyente. Además, como se ha visto, la bibliografía no siempre es coherente con respecto a estas relaciones, llegando a contradecirse en numerosas ocasiones, probablemente debido a que en la mayoría de los casos se estudió una única mutación frente a un único control y con un solo un clon analizado para cada condición.

En cualquier caso, las diferencias de tumorigenicidad que confieren diferentes ADNmt, no se pueden explicar a través de un único factor alterado. Aunque es cierto que en nuestro caso parece ser que el mecanismo inicial principal es una modificación en la función OXPHOS que desencadena una señal retrograda diferencial hacia el citoplasma y núcleo.

4.3.3 Señal retrograda en cáncer

Más allá de un mayor o menor rendimiento energético, la relevancia de la mitocondria en la tumorigenicidad de las células implica complejos procesos de señalización a través de iones, proteínas, metabolitos y especies reactivas del oxígeno (Butow and Avadhani, 2004; Horan et al., 2013; Monaghan and Whitmarsh, 2015; Wallace, 2012; Ward and Thompson, 2012).

Se han descrito numerosos elementos clave en respuesta a la señal retrograda mitocondrial, entre ellos se encuentra: el Calcio (Amuthan et al., 2001; Biswas et al., 1999), I κ B β (Tang et al., 2012), IF1 (Formentini et al., 2012a), NOX (Mitsushita et al., 2004), SRC (Porporato et al., 2014), Proteínas con centros Fe-S (Veatch et al., 2009), AKT (Pelicano et al., 2006b), HIF1 α (Iommarini et al., 2014) así como proteínas mitocondriales cuya localización celular y función varía en respuesta a cambios en la función mitocondrial (Monaghan and Whitmarsh, 2015). Además, en muchos de estos casos los ROS juegan un papel clave siendo uno de los elementos descritos más frecuentemente entre las diferentes publicaciones del área (Figura 18).

Existe además la posibilidad de que estas señales desde la mitocondria, estén implicados en el fenómeno de reprogramación de no-CSC a CSC (Cancer Stem Cell). Así, determinados metabotipos serían más propicios a mantener una mayor proporción de células madre del cáncer (Menendez and Alarcón, 2014; Menendez et al., 2013; Ye et al., 2011), lo cual podría explicar en parte las diferencias vistas en nuestro modelo ya que las CSCs se han asociado a un potencial tumorigénico mayor con una mayor resistencia a tratamientos (Martins-Neves et al., 2012; Yang et al., 2011).

Recientemente se han descrito una nueva serie de pequeños ORF en la secuencia del ADNmt que codifican polipéptidos con funciones señalizadoras (Lee et al., 2013, 2015). Uno de ellos, la Humanina está relacionada con la resistencia a diferentes tipos de stress (Yen et al., 2013) y a una resistencia mayor a apoptosis (Guo et al., 2003), por lo que su papel en el cáncer podría ser relevante (Mottaghi-Dastjerdi et al., 2014).

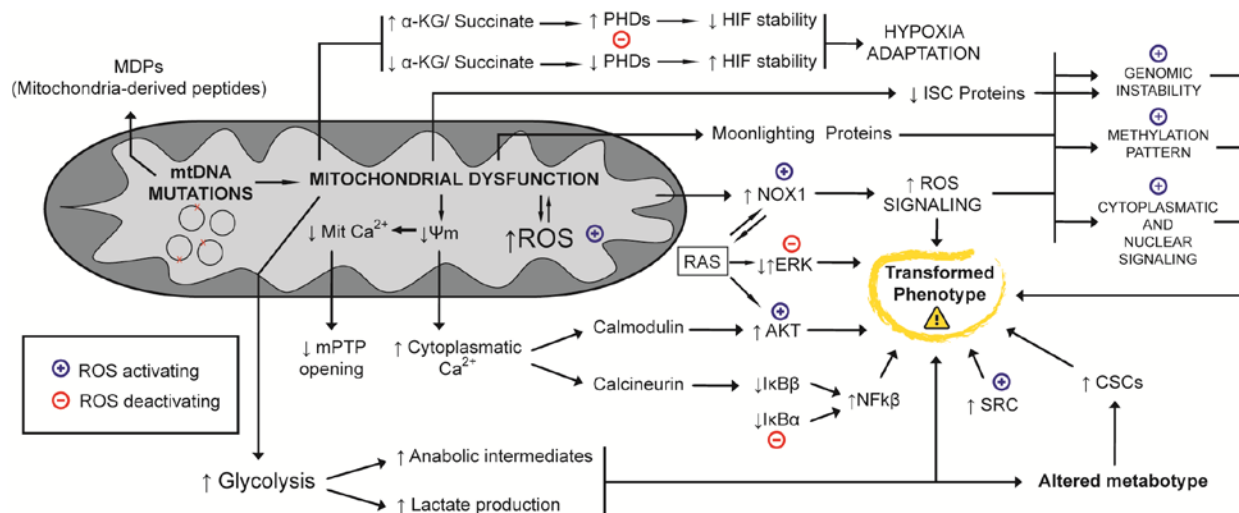


Figura 18: Señal retrograda mitocondrial implicada en la transformación tumoral. Con la disfunción mitocondrial como inicio se desarrollan diferentes vías descritas en la bibliografía con capacidad de alterar la capacidad tumoral de la célula. (↑) y (↓) indica aumento/activación o disminución/desactivación. (+) y (-) indica aumento/activación o disminución/desactivación mediado por ROS.

Uno de los trabajos más ilustrativos sobre la influencia del ADNmt y la función OXPHOS en la respuesta nuclear (Picard et al., 2014), demuestra cómo en una serie de híbridos con un aumento en la heteroplasmia para la mutación severa causante de MELAS m.3243G>A (0, 20, 30, 50, 60, 90 y 100% de copias mutadas), se producen numerosos cambios en la expresión de genes en función del defecto OXPHOS. Entre ellos se incluyen genes de la ruta glucolítica, sistemas antioxidantes, rutas de señalización etc. Curiosamente el patrón de muchos de estos cambios con la función OXPHOS presenta una curva en “U” o “campana” con una alteración similar para los extremos, lo que apoyaría porque en nuestro caso tanto una función completamente normal como una función completamente ausente se comportan de la misma forma.

En nuestro caso, la capacidad tumorigénica final de los diferentes híbridos surge como resultado de la combinación de diferentes factores pro y anti-tumorigénicos en respuesta a una diferente función OXPHOS. Dentro de las posibles combinaciones, son los híbridos portadores de mutaciones moderadas en el ADNmt los que reúnen la combinación de factores que favorecen más el fenotipo tumoral, con una mayor resistencia final a la apoptosis.

4.3.4 Implicaciones clínicas - Futuras direcciones

A pesar del gran número de estudios en líneas celulares, las relaciones metabólicas dentro del tumor de los pacientes sólo se están empezando a conocer. La visión de los tumores como masas uniformes, sin especialización, en las que la mitocondria juega un papel secundario empieza a pasar a un segundo plano. No todos los tumores presentan la misma función OXPHOS ni todas las células dentro del tumor presentan el mismo metabolismo, existiendo complejas relaciones entre los diferentes tipos celulares dentro de un tumor (Chaudhri et al., 2013; Curry et al., 2013; Martinez-Outschoorn et al., 2011; Salem et al., 2012).

El FDG-PET presenta ventajas por su mayor sensibilidad frente a otros sistemas diagnósticos y gracias al abaratamiento de los costes cada vez se utiliza más en la práctica clínica. Pese a su uso habitual, a día de hoy existe un desconocimiento sobre las implicaciones del complejo metabolismo tumoral en la captación de FDG por los tumores. Estudios sobre la función OXPHOS y el metabolismo glucolítico de los tumores *in vivo*, son de vital importancia a la hora de obtener más y mejor información de las imágenes FDG-PET, lo cual podría mejorar el valor diagnóstico y pronóstico de estas imágenes. Además, el conocimiento del metabolismo podría permitir el desarrollo de nuevos sistemas de imagen diagnóstica basados en las peculiaridades del metabolismo tumoral con respecto a los tejidos sanos (Zheng et al., 2015; Zhou et al., 2011).

Por otro lado, en la actualidad existe una necesidad importante de nuevas terapias sistémicas eficaces (Birsoy et al., 2014; Weinberg and Chandel, 2014; Zhao et al., 2013) así como de factores pronósticos potentes (Chaudhri et al., 2013; Cormio et al., 2015; Cuezva et al., 2004; Curry et al., 2013; Yuan et al., 2015), presentándose el metabolismo de los tumores como un buen objetivo para la búsqueda de ambos.

En definitiva, desentrañar el papel de la mitocondria en la biología de los tumores podría permitir el desarrollo de nuevas terapias así como la mejora del diagnóstico y pronóstico de los pacientes oncológicos.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Las mutaciones LHON producen un defecto moderado en el sistema OXPHOS, siendo la mutación m.3460G>A significativamente más leve que las mutaciones m.11778G>A y m.14484T>C que no mostraron diferencias entre sí.
2. La co-ocurrencia de las dos mutaciones primarias LHON m.11778G>A y m.14484T>C no parecen ejercer un efecto sumatorio en el modelo de cíbridos, coincidiendo con el fenotipo del paciente y sugiriendo un mecanismo común para estas dos mutaciones.
3. Durante el proceso de progresión tumoral en la serie epitelial MCA3D, PB, A5, CarC se produce una reprogramación metabólica hacia un metabolismo más glucolítico sin una disminución de la función mitocondrial.
4. Sin embargo, la alteración de la función mitocondrial en un modelo de cíbridos a través de diferentes mtDNAs modifican la capacidad tumorigénica de la línea tumoral 143B.
5. Tanto el ADNmt como la función OXPHOS son necesarias para mantener la tumorigenicidad.
6. La afectación moderada de la función mitocondrial incrementa la tumorigenicidad.
7. Esta capacidad tumorigénica aumentada es el resultado de una señal retrograda mitocondrial con múltiples rutas alteradas. Siendo la inhibición de la APOPTOSIS uno de los mecanismos principales.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Aanen, D.K., Spelbrink, J.N., and Beekman, M. (2014). What cost mitochondria? The maintenance of functional mitochondrial DNA within and across generations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130438.

Abbott, J. a, Francklyn, C.S., and Robey-Bond, S.M. (2014). Transfer RNA and human disease. *Front. Genet.* 5, 158.

Abdulhag, U.N., Soiferman, D., Schueler-Furman, O., Miller, C., Shaag, A., Elpeleg, O., Edvardson, S., and Saada, A. (2014). Mitochondrial complex IV deficiency, caused by mutated COX6B1, is associated with encephalomyopathy, hydrocephalus and cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 159–164.

Agaronyan, K., Morozov, Y.I., Anikin, M., and Temiakov, D. (2015). Mitochondrial biology. Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science* 347, 548–551.

Ahn, C.S., and Metallo, C.M. (2015). Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab.* 3, 1.

Altmann, R. (1894). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen* (Veit).

Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S.Y., Klein-Szanto, a, Vijayasarathy, C., and Avadhani, N.G. (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J.* 20, 1910–1920.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.

Andrews, B., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I.M., and Walker, J.E. (2013). Assembly factors for the membrane arm of human complex I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18934–18939.

Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., Pedersen, A.M.B., Rodenburg, R.J., van der Knaap, M.S., Smeitink, J. a M., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., et al. (2010). Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 115–122.

Babot, M., Birch, A., Labarbuta, P., and Galkin, A. (2014). Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1083–1092.

Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M.O., and Enríquez, J.A. (2012). NDUF4A is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab.* 16, 378–386.

Baracca, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Lenaz, G., Baruzzi, A., Schapira, A.H. V, Martinuzzi, A., and Carelli, V. (2005). Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch. Neurol.* 62, 730–736.

Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., and Birk, O.S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRQ. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1211–1216.

Battisti, C., Formichi, P., Cardaioli, E., Bianchi, S., Mangiavacchi, P., Tripodi, S. a, Tosi, P., and Federico, a (2004). Cell response to oxidative stress induced apoptosis in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1731–1736.

Bénit, P., Letouzé, E., Rak, M., Aubry, L., Burnichon, N., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., and Rustin, P. (2014). Unsuspected task for an old team: succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1330–1337.

Beretta, S., Mattavelli, L., Sala, G., Tremolizzo, L., Schapira, A.H. V, Martinuzzi, A., Carelli, V., and Ferrarese, C. (2004). Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain* 127, 2183–2192.

Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79, 1127–1155.

Birsoy, K., Possemato, R., and Lorbeer, F. (2014). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature* 508, 108–112.

Biswas, G., Adebajo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M., and Avadhani, N.G. (1999). Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J* 18, 522–533.

Bleier, L., Wittig, I., Heide, H., Steger, M., Brandt, U., and Dröse, S. (2015). Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 78, 1–10.

Bonora, M., and Pinton, P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front. Oncol.* 4, 302.

Bonora, M., Wieckowski, M.R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., and Pinton, P. (2015). Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 34, 1475–1486.

Bornstein, B., Mas, J.A., Patrono, C., Fernández-Moreno, M.A., González-Vioque, E., Campos, Y., Carrozzo, R., Martín, M.A., del Hoyo, P., Santorelli, F.M., et al. (2005). Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. *Biochem. J.* 387, 773–778.

Brand, M.D., and Esteves, T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2, 85–93.

Brandt, U. (2011). A two-state stabilization-change mechanism for proton-pumping complex I. *Biochim Biophys Acta* 1807, 1364–1369.

Brini, M., Pinton, P., King, M.P., Davidson, M., Schon, E.A., Rizzuto, R., Sciences, B., and Medicine, D. (1999). A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nat. Med.* 5, 951–954.

Brown, M.D., Sun, F., and Wallace, D.C. (1997). Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 381–387.

Brown, M.D., Trounce, I. a, Jun, A.S., Allen, J.C., and Wallace, D.C. (2000). Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J Biol Chem* 275, 39831–39836.

Butow, R.A., and Avadhani, N.G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14, 1–15.

Calabrese, C., Iommarini, L., Kurelac, I., Calvaruso, M.A., Capristo, M., Lollini, P.L., Nanni, P., Bergamini, C., Nicoletti, G., Giovanni, C.D., et al. (2013). Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. *Cancer Metab* 1, 11.

Carelli, V., Ross-Cisneros, F.N., and Sadun, A.A. (2002). Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: Genetic and acquired optic neuropathies. *Neurochem. Int.* 40, 573–584.

Cha, M.-Y., Kim, D.K., and Mook-Jung, I. (2015). The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.* 47, e150.

Chalmers, R.M., and Harding, a. E. (1996). A case-control study of Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 119, 1481–1486.

Chalmers, R.M., and Schapira, a. H.V. (1999). Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1410, 147–158.

Chatterjee, A., Mambo, E., and Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* 25, 4663–4674.

Chaudhri, V.K., Salzler, G.G., Dick, S. a, Buckman, M.S., Sordella, R., Karoly, E.D., Mohny, R., Stiles, B.M., Elemento, O., Altorki, N.K., et al. (2013). Metabolic alterations in lung cancer-associated fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of the tumor. *Mol. Cancer Res.* 11, 579–592.

Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18, R169–R176.

Chomyn, A., Meola, G., Bresolin, N., Lai, S.T., Scarlato, G., and Attardi, G. (1991). In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2236–2244.

Chomyn, A., Lai, S.T., Shakeley, R., Bresolin, N., Scarlato, G., and Attardi, G. (1994). Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 54, 966–974.

Clemente, P., Peralta, S., Cruz-Bermudez, A., Echevarría, L., Fontanesi, F., Barrientos, A., Fernandez-Moreno, M. a, and Garesse, R. (2013). hCOA3 stabilizes cytochrome c oxidase 1 (COX1) and promotes cytochrome c oxidase assembly in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* 288, 8321–8331.

Copeland, W.C. (2012). Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 64–74.

Copeland, W.C., and Longley, M.J. (2014). Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA Repair (Amst)*. 19, 190–198.

Cormio, A., Cormio, G., Musicco, C., Sardanelli, A.M., Gasparre, G., and Gadaleta, M.N. (2015). Mitochondrial changes in endometrial carcinoma: Possible role in tumor diagnosis and prognosis (Review). *Oncol. Rep.* 33, 1011–1018.

Cornelius, N., Frerman, F.E., Corydon, T.J., Palmfeldt, J., Bross, P., Gregersen, N., and Olsen, R.K.J. (2012). Molecular mechanisms of riboflavin responsiveness in patients with ETF-QO variations and multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3435–3448.

Correia, C., Lee, S.-H., Meng, X.W., Vincelette, N.D., Knorr, K.L.B., Ding, H., Nowakowski, G.S., Dai, H., and Kaufmann, S.H. (2015). Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*

Coskun, P., Wyrembak, J., Schriener, S.E., Chen, H.-W., Marciniack, C., Laferla, F., and Wallace, D.C. (2012). A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 553–564.

Cruz-Bermúdez, A., Vallejo, C., Vicente-blanco, R.J., Gallardo, M.E., Fernandez-Moreno, M.A., Quintanilla, M., and Garesse, R. (2015). Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. *Oncotarget* 6, 13628–13643.

Cuezva, J.M., Chen, G., Alonso, A.M., Isidoro, A., Misek, D.E., Hanash, S.M., and Beer, D.G. (2004). The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25, 1157–1163.

Curry, J.M., Tuluc, M., Whitaker-Menezes, D., Ames, J. a, Anantharaman, A., Butera, A., Leiby, B., Cognetti, D.M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., et al. (2013). Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle* 12, 1371–1384.

Damas, J., Samuels, D.C., Carneiro, J., Amorim, A., and Pereira, F. (2014). Mitochondrial DNA rearrangements in health and disease--a comprehensive study. *Hum. Mutat.* 35, 1–14.

Danielson, S.R., Wong, A., Carelli, V., Martinuzzi, A., Schapira, A.H. V, and Cortopassi, G. a (2002). Cells Bearing Mutations Causing Leber's Hereditary Optic Neuropathy Are Sensitized to Fas-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 5810–5815.

Desouki, M.M., Kulawiec, M., Bansal, S., Das, G.C., and Singh, K.K. (2005). Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1367–1373.

DiMauro, S., and Schon, E.A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656–2668.

Dröse, S., Krack, S., Sokolova, L., Zwicker, K., Barth, H.-D., Morgner, N., Heide, H., Steger, M., Nübel, E., Zickermann, V., et al. (2011). Functional dissection of the proton pumping modules of mitochondrial complex I. *PLoS Biol.* 9, e1001128.

Dröse, S., Brandt, U., and Wittig, I. (2014). Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 1344–1354.

Edvardson, S., Shaag, A., Kolesnikova, O., Gomeri, J.M., Tarasov, I., Einbinder, T., Saada, A., and Elpeleg, O. (2007). Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 857–862.

Efremov, R.G., Baradaran, R., and Sazanov, L.A. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465, 441–445.

Emmanuele, V., López, L.C., López, L., Berardo, A., Naini, A., Tadesse, S., Wen, B., D'Agostino, E., Solomon, M., DiMauro, S., et al. (2012). Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch. Neurol.* 69, 978–983.

Formentini, L., Martinez-Reyes, I., and Cuezva, J.M. (2010). The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB Life* 62, 554–560.

Formentini, L., Sanchez-Arago, M., Sanchez-Cenizo, L., and Cuezva, J.M. (2012a). The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Mol Cell* 45, 731–742.

Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L., and Cuezva, J.M. (2012b). The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Mol. Cell* 45, 731–742.

Formosa, L.E., Mimaki, M., Frazier, A.E., McKenzie, M., Stait, T.L., Thorburn, D.R., Stroud, D. a, and Ryan, M.T. (2015). Characterization of mitochondrial FOXRED1 in the assembly of respiratory chain complex I. *Hum. Mol. Genet.* 1–14.

Frisch, S.M., and Schaller, M.D. (2014). The wind god promotes lung cancer. *Cancer Cell* 25, 551–552.

Fukuhara, N., Tokiguchi, S., Shirakawa, K., and Tsubaki, T. (1980). Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): Disease entity or a syndrome? *J. Neurol. Sci.* 47, 117–133.

Gallardo, M.E., García-Pavía, P., Chamorro, R., Vázquez, M.E., Gómez-Bueno, M., Millán, I., Almoguera, B., Domingo, V., Segovia, J., Vilches, C., et al. (2012). Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *Eur. Heart J.* 33, 346–353.

Gasparre, G., Kurelac, I., Capristo, M., Iommarini, L., Ghelli, A., Ceccarelli, C., Nicoletti, G., Nanni, P., De Giovanni, C., Scotlandi, K., et al. (2011). A mutation threshold distinguishes the antitumorigenic effects of the mitochondrial gene MTND1, an oncojanus function. *Cancer Res* 71, 6220–6229.

Gasparre, G., Porcelli, A.M., Lenaz, G., and Romeo, G. (2013). Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.

Gaude, E., and Frezza, C. (2014). Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab.* 2, 10.

Ghelli, A., Zanna, C., Porcelli, A.M., Schapira, A.H. V., Martinuzzi, A., Carelli, V., and Rugolo, M. (2003). Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J. Biol. Chem.* 278, 4145–4150.

Ghezzi, D., and Zeviani, M. (2012). Assembly Factors of Human Mitochondrial Respiratory Chain Complexes: Physiology and Pathophysiology (New York, NY: Springer New York).

Ghisla, S., and Thorpe, C. (2004). Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur. J. Biochem.* 271, 494–508.

Giordano, C., Iommarini, L., Giordano, L., Maresca, A., Pisano, A., Valentino, M.L., Caporali, L., Liguori, R., Deceglie, S., Roberti, M., et al. (2014). Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 137, 335–353.

Gómez-Durán, A., Pacheu-Grau, D., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., López-Pérez, M.J., and Ruiz-Pesini, E. (2010). Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3343–3353.

Gómez-Durán, A., Pacheu-Grau, D., Martínez-Romero, I., López-Gallardo, E., López-Pérez, M.J., Montoya, J., and Ruiz-Pesini, E. (2012). Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1216–1222.

Gray, M.W. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011403.

Greaves, L.C., Reeve, A.K., Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2012). Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol* 226, 274–286.

- Griffiths, E.J., and Rutter, G. a (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1324–1333.
- Grünert, S.C. (2014). Clinical and genetical heterogeneity of late-onset multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 117.
- Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A.C., and Reed, J.C. (2003). Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423, 456–461.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hao, H., Morrison, L.E., and Moraes, C.T. (1999). Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1117–1124.
- Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J.M., Boutron, A., Legrand, A., and Slama, A. (2003). A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum. Genet.* 113, 118–122.
- Hayashi, J., Werbin, H., and Shay, J.W. (1986). Effects of normal human fibroblast mitochondrial DNA on segregation of HeLaTG Mitochondrial DNA and on tumorigenicity of HeLaTG cells. *Cancer Res* 46, 4001–4006.
- Hayashi, J., Takemitsu, M., and Nonaka, I. (1992). Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by introduction of mitochondrial DNA from normal human cells. *Somat Cell Mol Genet* 18, 123–129.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* (80-.). 324, 1029–1033.
- Hejzlarová, K., and Mráček, T. (2014). Nuclear Genetic Defects of Mitochondrial ATP Synthase. *Physiol. ...* 63.
- Hoberman, H.D. (1975). Is there a role for mitochondrial genes in carcinogenesis? *Cancer Res.* 35, 3332–3335.
- Hoefs, S.J.G., Dieteren, C.E.J., Distelmaier, F., Janssen, R.J.R.J., Epplen, A., Swarts, H.G.P., Forkink, M., Rodenburg, R.J., Nijtmans, L.G., Willems, P.H., et al. (2008). NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1306–1315.
- Hoefs, S.J.G., van Spronsen, F.J., Lenssen, E.W.H., Nijtmans, L.G., Rodenburg, R.J., Smeitink, J.A.M., and van den Heuvel, L.P. (2011). NDUFA10 mutations cause complex I deficiency in a patient with Leigh disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 270–274.
- Hoek, J.B., Cahill, A., and Pastorino, J.G. (2002). Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 122, 2049–2063.

- Hogeboom, G.H., Schneider, W.C., and Pallade, G.E. (1948). Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J Biol Chem* 172, 619–635.
- Horan, M.P., Gemmell, N.J., and Wolff, J.N. (2013). From evolutionary bystander to master manipulator: the emerging roles for the mitochondrial genome as a modulator of nuclear gene expression. *Eur J Hum Genet* 21, 1335–1337.
- Howell, a N., and Sager, R. (1978). Tumorigenicity and its suppression in cybrids of mouse and Chinese hamster cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2358–2362.
- Howell, N., Xu, M., Halvorson, S., Bodis-Wollner, I., Sherman, J., Gerdes, J., and Becker, M. (1994). A heteroplasmic LHON family: tissue distribution and transmission of the 11778 mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 203–206.
- Hudson, G., Carelli, V., Spruijt, L., Gerards, M., Mowbray, C., Achilli, A., Pyle, A., Elson, J., Howell, N., La Morgia, C., et al. (2007). Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 228–233.
- Hunte, C., Zickermann, V., and Brandt, U. (2010). Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* (80-.). 329, 448–451.
- Huoponen, K. (2001). Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. *Neurogenetics* 3, 119–125.
- Iommarini, L., Kurelac, I., Capristo, M., Calvaruso, M.A., Giorgio, V., Bergamini, C., Ghelli, A., Nanni, P., De Giovanni, C., Carelli, V., et al. (2014). Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Hum Mol Genet* 23, 1453–1466.
- Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J.-I. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320, 661–664.
- Itsara, L.S., Kennedy, S.R., Fox, E.J., Yu, S., Hewitt, J.J., Sanchez-Contreras, M., Cardozo-Pelaez, F., and Pallanck, L.J. (2014). Oxidative stress is not a major contributor to somatic mitochondrial DNA mutations. *PLoS Genet.* 10, e1003974.
- Ju, Y.S., Alexandrov, L.B., Gerstung, M., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Ramakrishna, M., Davies, H.R., Papaemmanuil, E., Gundem, G., Shlien, A., et al. (2014). Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife* 3, 1–28.
- Juvonen, V., Nikoskelainen, E., Lamminen, T., Penttinen, M., Aula, P., and Savontaus, M.L. (1997). Tissue distribution of the ND4/11778 mutation in heteroplasmic lineages with Leber hereditary optic neuropathy. *Hum. Mutat.* 9, 412–417.

Kaiparettu, B.A., Ma, Y., and Wong, L.J. (2010). Functional effects of cancer mitochondria on energy metabolism and tumorigenesis: utility of transmitochondrial cybrids. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 137–146.

Kaiparettu, B.A., Ma, Y., Park, J.H., Lee, T.L., Zhang, Y., Yotnda, P., Creighton, C.J., Chan, W.Y., and Wong, L.J. (2013). Crosstalk from non-cancerous mitochondria can inhibit tumor properties of metastatic cells by suppressing oncogenic pathways. *PLoS One* 8, e61747.

Kamata, T. (2009). Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Sci* 100, 1382–1388.

Kazuno, A., Munakata, K., Nagai, T., Shimosono, S., Tanaka, M., Yoneda, M., Kato, N., Miyawaki, A., and Kato, T. (2006). Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet.* 2, e128.

Kazuno, A., Munakata, K., Tanaka, M., Kato, N., and Kato, T. (2008). Relationships between mitochondrial DNA subhaplogroups and intracellular calcium dynamics. *Mitochondrion* 8, 164–169.

Kemp, J.P., Smith, P.M., Pyle, A., Neeve, V.C.M., Tuppen, H. a L., Schara, U., Talim, B., Topaloglu, H., Holinski-Feder, E., Abicht, A., et al. (2011). Nuclear factors involved in mitochondrial translation cause a subgroup of combined respiratory chain deficiency. *Brain* 134, 183–195.

Kenney, M.C., Chwa, M., Atilano, S.R., Falatoonzadeh, P., Ramirez, C., Malik, D., Tarek, M., Del Carpio, J.C., Nesburn, A.B., Boyer, D.S., et al. (2014). Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 208–219.

Kerrison, J.B., Howell, N., Miller, N.R., Hirst, L., and Green, W.R. (1995). Leber hereditary optic neuropathy. Electron microscopy and molecular genetic analysis of a case. *Ophthalmology* 102, 1509–1516.

King, M.P., and Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* (80-.). 246, 500–503.

King, A., Selak, M.A., and Gottlieb, E. (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25, 4675–4682.

Kingsbury, B.F. (1912). Cytoplasmic fixation. *Anat. Rec.* 6, 39–52.

Kirches, E. (2011). LHON: Mitochondrial Mutations and More. *Curr Genomics* 12, 44–54.

Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360–364.

Kirkinezos, I.G., and Moraes, C.T. (2001). Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 449–457.

Kirkman, M.A., Yu-Wai-Man, P., Korsten, A., Leonhardt, M., Dimitriadis, K., De Coo, I.F., Klopstock, T., and Chinnery, P.F. (2009). Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain* 132, 2317–2326.

Von Kleist-Retzow, J.-C., Hornig-Do, H.-T., Schauen, M., Eckertz, S., Dinh, T.A.D., Stassen, F., Lottmann, N., Bust, M., Galunska, B., Wielckens, K., et al. (2007). Impaired mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels. *Exp. Cell Res.* 313, 3076–3089.

Kobayashi, Y., Momoi, M.Y., Tominaga, K., Momoi, T., Nihei, K., Yanagisawa, M., Kagawa, Y., and Ohta, S. (1990). A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in melas (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 816–822.

Koppen, M., and Langer, T. (2007). Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 221–242.

Kulawiec, M., Owens, K.M., and Singh, K.K. (2009). mtDNA G10398A variant in African-American women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice. *J. Hum. Genet.* 54, 647–654.

Kunz, W.S. (2013). Special Review Series – Biogenesis and Physiological Adaptation of Mitochondria Different metabolic properties of mitochondrial oxidative phosphorylation in different cell types – important implications for mitochondrial cytopathies *Experimental Physiology*.

De la Fuente, S., Fonteriz, R.I., de la Cruz, P.J., Montero, M., and Alvarez, J. (2012). Mitochondrial free [Ca²⁺] dynamics measured with a novel low-Ca²⁺-affinity aequorin probe. *Biochem. J.* 445, 371–376.

Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P.M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M.A., et al. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* (80-.). 340, 1567–1570.

Larman, T.C., DePalma, S.R., Hadjipanayis, A.G., Protopopov, A., Zhang, J., Gabriel, S.B., Chin, L., Seidman, C.E., Kucherlapati, R., and Seidman, J.G. (2012). Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14087–14091.

Larsson, N.G., Andersen, O., Holme, E., Oldfors, A., and Wahlström, J. (1991). Leber's hereditary optic neuropathy and complex I deficiency in muscle. *Ann. Neurol.* 30, 701–708.

Leber, T. (1871). Ueber hereditäre und congenital-angelegte Sehnervenleiden. *Albr. von Gräfe's Arch. Für Ophthalmol.* 17, 249–291.

Lee, C., Yen, K., and Cohen, P. (2013). Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol Metab* 24, 222–228.

- Lee, C., Zeng, J., Drew, B.G., Sallam, T., Martin-Montalvo, A., Wan, J., Kim, S.-J., Mehta, H., Hevener, A.L., de Cabo, R., et al. (2015). The Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Promotes Metabolic Homeostasis and Reduces Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab.* *21*, 443–454.
- Lehninger, A.L., Rossi, C.S., and Greenawalt, J.W. (1963). Respiration-dependent accumulation of inorganic phosphate and Ca ions by rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* *10*, 444–448.
- Lenaz, G., Baracca, A., Carelli, V., D'Aurelio, M., Sgarbi, G., and Solaini, G. (2004). Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. *Biochim Biophys Acta* *1658*, 89–94.
- Levin, L. (2007). Mechanisms of retinal ganglion specific-cell death in Leber hereditary optic neuropathy. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* *105*, 379–391.
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J.W., Yustein, J.T., Lee, L.A., and Dang, C. V (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* *25*, 6225–6234.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. a, Webert, H., Wilbrecht, C., and Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 1491–1508.
- Liou, C.-W., Lin, T.-K., Chen, J.-B., Tiao, M.-M., Weng, S.-W., Chen, S.-D., Chuang, Y.-C., Chuang, J.-H., and Wang, P.-W. (2010). Association between a common mitochondrial DNA D-loop polycytosine variant and alteration of mitochondrial copy number in human peripheral blood cells. *J. Med. Genet.* *47*, 723–728.
- Lodi, T., Dallabona, C., Nolli, C., Goffrini, P., Donnini, C., and Baruffini, E. (2015). DNA polymerase γ and disease: what we have learned from yeast. *Front. Genet.* *6*, 106.
- Lu, Y.-W., and Claypool, S.M. (2015). Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front. Genet.* *6*, 3.
- Mailloux, R.J., and Harper, M.-E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 1106–1115.
- Maiuri, M.C., and Kroemer, G. (2015). Essential Role for Oxidative Phosphorylation in Cancer Progression. *Cell Metab.* *21*, 11–12.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* *40*, 294–309.
- Man, P.Y., Turnbull, D.M., and Chinnery, P.F. (2002). Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* *39*, 162–169.
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A.I., Lenaz, G., and Genova, M.L. (2013). Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxid Redox Signal.*

Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., et al. (2009). Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* 361, 1058–1066.

Margulis, L. (1971). The origin of plant and animal cells. *Am. Sci.* 59, 230–235.

Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Trimmer, C., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R.G., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2011). Cancer cells metabolically “fertilize” the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: Implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle* 10, 2504–2520.

Martínez-Reyes, I., and Cuezva, J.M. (2014). The H(+)-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1099–1112.

Martins-Neves, S.R., Lopes, Á.O., do Carmo, A., Paiva, A. a, Simões, P.C., Abrunhosa, A.J., and Gomes, C.M.F. (2012). Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line. *BMC Cancer* 12, 139.

Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D’Adamo, P., Gasparini, P., and Zeviani, M. (2008). Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1281–1289.

Menendez, J. a, and Alarcón, T. (2014). Metabostemness: a new cancer hallmark. *Front. Oncol.* 4, 262.

Menendez, J.A., Joven, J., Cufí, S., Corominas-Faja, B., Oliveras-Ferraros, C., Cuyàs, E., Martin-Castillo, B., Lopez-Bonet, E., Alarcón, T., Vazquez-Martin, A., et al. (2013). The Warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle* 12, 1166–1179.

Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, a. G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., et al. (2002). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 171–176.

Mitsushita, J., Lambeth, J.D., and Kamata, T. (2004). The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* 64, 3580–3585.

Monaghan, R.M., and Whitmarsh, A.J. (2015). Mitochondrial Proteins Moonlighting in the Nucleus. *Trends Biochem. Sci.* xx, 1–8.

Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., Garcia-Consuegra, I., Martin, M.A., Arenas, J., Barrientos, A., and Ugalde, C. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 15, 324–335.

Morgan, J.E. (2004). Circulation and axonal transport in the optic nerve. *Eye (Lond).* 18, 1089–1095.

Morgan, M.J., and Liu, Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21, 103–115.

Morgia, C. La, Carbonelli, M., Barboni, P., Sadun, A.A., and Carelli, V. (2014). Medical management of hereditary optic neuropathies. *Front. Neurol.* 5, 1–7.

Mottaghi-Dastjerdi, N., Soltany-Rezaee-Rad, M., Sepehrizadeh, Z., Roshandel, G., Ebrahimifard, F., and Setayesh, N. (2014). Genome expression analysis by suppression subtractive hybridization identified overexpression of Humanin, a target gene in gastric cancer chemoresistance. *Daru* 22, 14.

Moudy, A.M., Handran, S.D., Goldberg, M.P., Ruffin, N., Karl, I., Kranz-Eble, P., DeVivo, D.C., and Rothman, S.M. (1995). Abnormal calcium homeostasis and mitochondrial polarization in a human encephalomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 729–733.

Mroczek-Tońska, K., Kisiel, B., Piechota, J., and Bartnik, E. (2003). Leber hereditary optic neuropathy--a disease with a known molecular basis but a mysterious mechanism of pathology. *J. Appl. Genet.* 44, 529–538.

Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064–49073.

Nass, M. (1966). The circularity of mitochondrial DNA. ... *Natl. Acad. Sci. United ...* 1215–1222.

Nicholls, T.J., Rorbach, J., and Minczuk, M. (2013). Mitochondria: mitochondrial RNA metabolism and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 845–849.

Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145–1159.

O'Rourke, B. (2010). From bioblasts to mitochondria: ever expanding roles of mitochondria in cell physiology. *Front. Physiol.* 1, 7.

Park, J.S., Sharma, L.K., Li, H., Xiang, R., Holstein, D., Wu, J., Lechleiter, J., Naylor, S.L., Deng, J.J., Lu, J., et al. (2009). A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis. *Hum Mol Genet* 18, 1578–1589.

Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* (80-.). 321, 1807–1812.

Patron, M., Raffaello, A., Granatiero, V., Tosatto, A., Merli, G., De Stefani, D., Wright, L., Pallafacchina, G., Terrin, A., Mammucari, C., et al. (2013). The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *J. Biol. Chem.* 288, 10750–10758.

Patsi, J., Kervinen, M., Finel, M., and Hassinen, I.E. (2008). Leber hereditary optic neuropathy mutations in the ND6 subunit of mitochondrial complex I affect ubiquinone reduction kinetics in a bacterial model of the enzyme. *Biochem. J.* 409, 129–137.

Pätsi, J., Maliniemi, P., Pakanen, S., Hinttala, R., Uusimaa, J., Majamaa, K., Nyström, T., Kervinen, M., and Hassinen, I.E. (2012). LHON/MELAS overlap mutation in ND1 subunit of mitochondrial complex I affects ubiquinone binding as revealed by modeling in *Escherichia coli* NDH-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 312–318.

Pedersen, P.L., Greenawalt, J.W., Chan, T.L., Hepatomas, M., and Morris, H.P. (1970). A Comparison of Some Ultrastructural and Biochemical Properties of Mitochondria from Morris Hepatomas 9618A, 7800, and 3924A. A Comparison of Some Ultrastructural and Biochemical Properties of. 2620–2626.

Pelicano, H., Xu, R.-H.H., Du, M., Feng, L., Sasaki, R., Carew, J.S., Hu, Y., Ramdas, L., Hu, L., Keating, M.J., et al. (2006a). Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J. Cell Biol.* 175, 913–923.

Pelicano, H., Xu, R.H., Du, M., Feng, L., Sasaki, R., Carew, J.S., Hu, Y., Ramdas, L., Hu, L., Keating, M.J., et al. (2006b). Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol* 175, 913–923.

Pello, Martin, M.A., Carelli, V., Nijtmans, L.G., Achilli, A., Pala, M., Torroni, A., Gomez-Duran, A., Ruiz-Pesini, E., Martinuzzi, A., et al. (2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 17, 4001–4011.

Peralta, D., Bronowska, A.K., Morgan, B., Dóka, É., Van Laer, K., Nagy, P., Gräter, F., and Dick, T.P. (2015). A proton relay enhances H₂O₂ sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation. *Nat. Chem. Biol.* 11.

Petros, J.A., Baumann, A.K., Ruiz-Pesini, E., Amin, M.B., Sun, C.Q., Hall, J., Lim, S., Issa, M.M., Flanders, W.D., Hosseini, S.H., et al. (2005). mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 719–724.

Picard, M., Zhang, J., Hancock, S., Derbeneva, O., Golhar, R., Golik, P., O’Hearn, S., Levy, S., Potluri, P., Lvova, M., et al. (2014). Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Piotrowska, A., Korwin, M., Bartnik, E., and Tońska, K. (2015). Leber hereditary optic neuropathy - historical report in comparison with the current knowledge. *Gene* 555, 41–49.

Porporato, P.E., Payen, V.L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C.J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., et al. (2014). A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep.* 8, 754–766.

Powell, C. a, Nicholls, T.J., and Minczuk, M. (2015). Nuclear-encoded factors involved in post-transcriptional processing and modification of mitochondrial tRNAs in human disease. *Front. Genet.* 6, 79.

Pyle, A., Hudson, G., Wilson, I.J., Coxhead, J., Smertenko, T., Herbert, M., Santibanez-Koref, M., and Chinnery, P.F. (2015). Extreme-Depth Re-sequencing of Mitochondrial DNA Finds No Evidence of Paternal Transmission in Humans. *PLoS Genet.* 11, e1005040.

- Qi, X., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W., and Guy, J. (2003). Optic Neuropathy Induced by Reductions in Mitochondrial Superoxide Dismutase. *44*, 1088–1096.
- Qi, X., Lewin, A.S., Sun, L., Hauswirth, W.W., and Guy, J. (2004). SOD2 gene transfer protects against optic neuropathy induced by deficiency of complex I. *Ann. Neurol.* *56*, 182–191.
- Rand, D.M., Haney, R.A., and Fry, A.J. (2004). Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends Ecol. Evol.* *19*, 645–653.
- Renkema, G.H., Wortmann, S.B., Smeets, R.J., Venselaar, H., Antoine, M., Visser, G., Ben-Omran, T., van den Heuvel, L.P., Timmers, H.J.L.M., Smeitink, J.A., et al. (2015). SDHA mutations causing a multisystem mitochondrial disease: novel mutations and genetic overlap with hereditary tumors. *Eur. J. Hum. Genet.* *23*, 202–209.
- Riley, L.G., Cooper, S., Hickey, P., Rudinger-Thirion, J., McKenzie, M., Compton, A., Lim, S.C., Thorburn, D., Ryan, M.T., Giegé, R., et al. (2010). Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia--MLASA syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *87*, 52–59.
- Riordan-Eva, P., and Harding, A.E. (1995). Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med Genet* *32*, 81–87.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 566–578.
- Roberts, S. a., and Gordenin, D. a. (2014). Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 786–800.
- Roberts, S. a, Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S. a, Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G. V, Carter, S.L., Saksena, G., et al. (2013). An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat. Genet.* *45*, 970–976.
- De Rocco, D., Cerqua, C., Goffrini, P., Russo, G., Pastore, A., Meloni, F., Nicchia, E., Moraes, C.T., Pecci, A., Salviati, L., et al. (2013). Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* *1842*, 1–6.
- Rossignol, R., Letellier, T., Malgat, M., Rocher, C., and Mazat, J.P. (2000). Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem. J.* *347 Pt 1*, 45–53.
- Ruiz-pesini, E., Lapen, A., D1, C., Montoya, J., Alvarez, E., D1, M., Urrie, A., Montoro, L., Lo, M.J., and Enri, A. (2000). Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. *682–696*.
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., and Brandon, M. (2004). Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science (80-.)*. *303*, 223–227.

Sabharwal, S.S., and Schumacker, P.T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* 14, 709–721.

Salem, A.F., Whitaker-Menezes, D., Lin, Z., Martinez-Outschoorn, U.E., Tanowitz, H.B., Al-Zoubi, M.S., Howell, A., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2012). Two-compartment tumor metabolism: autophagy in the tumor microenvironment and oxidative mitochondrial metabolism (OXPHOS) in cancer cells. *Cell Cycle* 11, 2545–2556.

Sapp, J. (2007). Mitochondria and their host: Morphology to Molecular Phylogeny. In *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes*, pp. 57–59.

Schapira, A.H. V (2006). Mitochondrial disease. *Lancet* 368, 70–82.

Scheper, G.C., van der Klok, T., van Andel, R.J., van Berkel, C.G.M., Sissler, M., Smet, J., Muravina, T.I., Serkov, S. V, Uziel, G., Bugiani, M., et al. (2007). Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat. Genet.* 39, 534–539.

Sharma, L.K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J., and Bai, Y. (2011). Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Hum Mol Genet* 20, 4605–4616.

Sheftel, A., Stehling, O., and Lill, R. (2010). Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 302–314.

Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, J.Q., Manfredi, G., Oda, H., and Ohta, S. (2005). Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 65, 1655–1663.

Shoffner, J.M., and Wallace, D.C. (1992). Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 1179–1186.

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M.S., Seibel, P., Ballinger, S.W., and Wallace, D.C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 61, 931–937.

Smith, K.H. (1993). Heteroplasmy in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Arch. Ophthalmol.* 111, 1486.

Smith, P.R., Cooper, J.M., Govan, G.G., Harding, A.E., and Schapira, A.H. (1993). Smoking and mitochondrial function: a model for environmental toxins. *Q. J. Med.* 86, 657–660.

Soto-Hermida, A., Fernández-Moreno, M., Oreiro, N., Fernández-López, C., Pérttega, S., Cortés-Pereira, E., Rego-Pérez, I., and Blanco, F.J. (2014). Mitochondrial DNA (mtDNA) Haplogroups Influence the Progression of Knee Osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI). *PLoS One* 9, e112735.

Stumpf, J.D., Saneto, R.P., and Copeland, W.C. (2013). Clinical and Molecular Features of POLG -Related Mitochondrial Disease.

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 621–632.

Tan, A.S., Baty, J.W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M., Yan, B., et al. (2015). Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metab.* *21*, 81–94.

Tang, W., Chowdhury, A.R., Guha, M., Huang, L., Van Winkle, T., Rustgi, A.K., and Avadhani, N.G. (2012). Silencing of I κ B β mRNA causes disruption of mitochondrial retrograde signaling and suppression of tumor growth in vivo. *Carcinogenesis* *33*, 1762–1768.

Tarasov, A.I., Griffiths, E.J., and Rutter, G.A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca²⁺. *Cell Calcium* *52*, 28–35.

Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordóñez, Á., Corral-Escariz, M., Soro, I., López-Bernardo, E., Perales-Clemente, E., et al. (2011). Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 α decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity. *Cell Metab.* *14*, 768–779.

Torroni, A., and Petrozzi, M. (1997). Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by. *Am. J. ...* 1107–1121.

Trevelyan, A.J., Kirby, D.M., Smulders-Srinivasan, T.K., Nooteboom, M., Acin-Perez, R., Enriquez, J.A., Whittington, M. a, Lightowers, R.N., and Turnbull, D.M. (2010). Mitochondrial DNA mutations affect calcium handling in differentiated neurons. *Brain* *133*, 787–796.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* *429*, 417–423.

Tuppen, H. a L., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2010a). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 113–128.

Tuppen, H.A.L., Hogan, V.E., He, L., Blakely, E.L., Worgan, L., Al-Dosary, M., Saretzki, G., Alston, C.L., Morris, A.A., Clarke, M., et al. (2010b). The p.M292T NDUF52 mutation causes complex I-deficient Leigh syndrome in multiple families. *Brain* *133*, 2952–2963.

Ugalde, C., Vogel, R., Huijbens, R., Van Den Heuvel, B., Smeitink, J., and Nijtmans, L. (2004). Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 2461–2472.

Vallejo, C.G., Cruz-Bermúdez, A., Clemente, P., Hernández-Sierra, R., Garesse, R., Quintanilla, M., Cruz-Bermudez, A., Clemente, P., Hernandez-Sierra, R., Garesse, R., et al. (2013). Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis. *Biochimie* *95*, 1171–1176.

- Veatch, J.R., McMurray, M. a, Nelson, Z.W., and Gottschling, D.E. (2009). Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell* *137*, 1247–1258.
- Wahl, R.L., Cody, R.L., Hutchins, G.D., and Mudgett, E.E. (1991). Primary and metastatic breast carcinoma: initial clinical evaluation with PET with the radiolabeled glucose analogue 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Radiology* *179*, 765–770.
- Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* (80-.). *283*, 1482–1488.
- Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 685–698.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas 2nd, L.J., and Nikoskelainen, E.K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* (80-.). *242*, 1427–1430.
- Wallin, I.E. (1926). BACTERIA AND THE ORIGIN OF SPECIES. *Science* *64*, 173–175.
- Wang, C., Wang, Y., Wang, H., Zhang, R., and Guo, Z. (2014). Mitochondrial DNA haplogroup N is associated good outcome of gastric cancer. *Tumour Biol.* *35*, 12555–12559.
- Warburg, O. (1913). Über sauerstoffatmende Körnchen aus Leberzellen und über Sauerstoffatmung in Berkefeld-Filtraten wässriger Leberextrakte. *Pflüger's Arch. für die gesamte Physiol. des Menschen und der Tiere* *154*, 599–617.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* *8*, 519–530.
- Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* *21*, 297–308.
- Weinberg, S.E., and Chandel, N.S. (2014). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 9–15.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 8788–8793.
- Weinert, B.T., Schölz, C., Wagner, S. a, Iesmantavicius, V., Su, D., Daniel, J. a, and Choudhary, C. (2013). Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep.* *4*, 842–851.
- Willems, P.H.G.M., Valsecchi, F., Distelmaier, F., Verkaart, S., Visch, H.-J., Smeitink, J. a M., and Koopman, W.J.H. (2008). Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Cell Calcium* *44*, 123–133.

Wolff, J.N., Ladoukakis, E.D., Enríquez, J. a, and Dowling, D.K. (2014). Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130443.

Wong, A., Cavelier, L., Collins-schramm, H.E., Seldin, M.F., McGrogan, M., Savontaus, M., and Cortopassi, G.A. (2002). Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *II*, 431–438.

Wooten, J., Chouchane, S., and McGrath, T. (2006). Tobacco Smoke Constituents Affecting Oxidative Stress. In *Cigarette Smoke and Oxidative Stress SE - 2*, B. Halliwell, and H. Poulsen, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 5–46.

Yang, M., Yan, M., Zhang, R., Li, J., and Luo, Z. (2011). Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Sci.* 102, 1774–1781.

Ye, X.-Q., Li, Q., Wang, G.-H., Sun, F.-F., Huang, G.-J., Bian, X.-W., Yu, S.-C., and Qian, G.-S. (2011). Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int. J. Cancer.* 129, 820–831.

Yen, K., Lee, C., Mehta, H., and Cohen, P. (2013). The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol* 50, R11–R19.

Ylikallio, E., and Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann. Med.* 44, 41–59.

Yuan, Y., Wang, W., Li, H., Yu, Y., Tao, J., Huang, S., and Zeng, Z. (2015). Nonsense and Missense Mutation of Mitochondrial ND6 gene promotes cell migration and invasion in human lung adenocarcinoma. *BMC Cancer* 15, 346.

Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Hudson, G., and Chinnery, P.F. (2009). Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* 46, 145–158.

Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., and Chinnery, P.F. (2011). Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye Res.* 30, 81–114.

Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Martinuzzi, A., Carelli, V., and Rugolo, M. (2005). Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G. *Apoptosis* 10, 997–1007.

Zaugg, K., Yao, Y., Reilly, P.T., Kannan, K., Kiarash, R., Mason, J., Huang, P., Sawyer, S.K., Fuerth, B., Faubert, B., et al. (2011). Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev* 25, 1041–1051.

Zhao, Y., Butler, E.B., and Tan, M. (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* 4, e532.

Zheng, X., Wang, X., Mao, H., Wu, W., Liu, B., and Jiang, X. (2015). Hypoxia-specific ultrasensitive detection of tumours and cancer cells in vivo. *Nat. Commun.* 6, 5834.

Zhou, Y., Kim, Y.S., Yan, X., Jacobson, O., Chen, X., and Liu, S. (2011). ^{64}Cu -labeled lissamine rhodamine B: a promising PET radiotracer targeting tumor mitochondria. *Mol Pharm* 8, 1198–1208.

Zickermann, V., Wirth, C., and Nasiri, H. (2015). Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* (80-.). 347, 4–9.

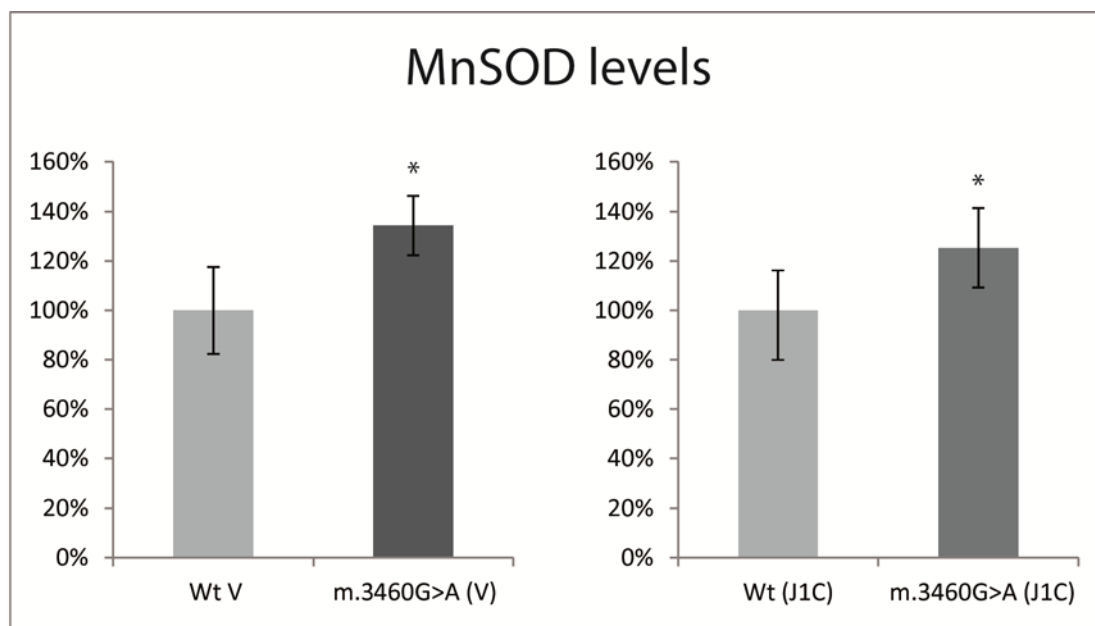
Zimorski, V., Ku, C., Martin, W.F., and Gould, S.B. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr. Opin. Microbiol.* 22, 38–48.

ANEXOS

7. ANEXOS

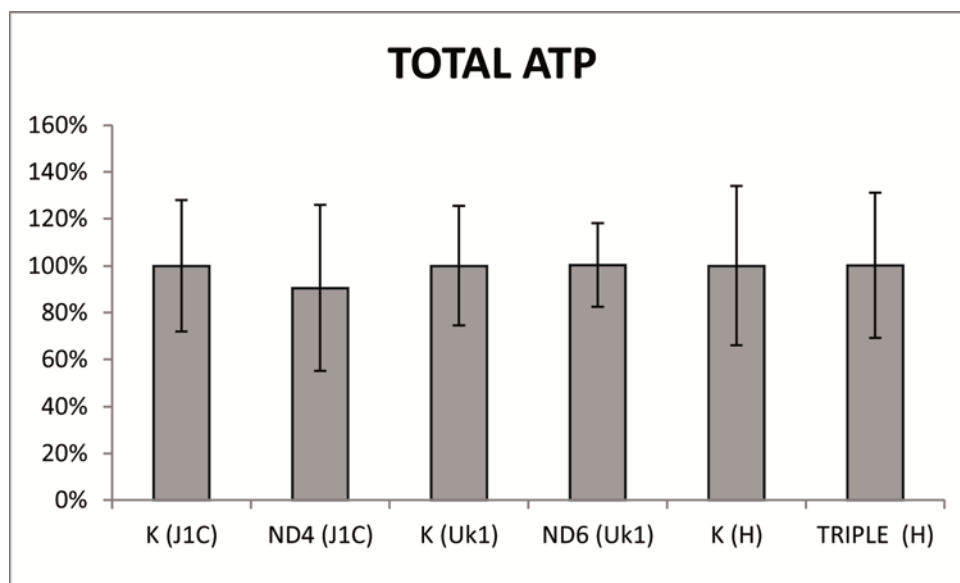
Por mantener la coherencia de estilo con el resto del documento, las figuras del anexo se presentaran en inglés, a pesar de estar referenciadas en el texto en castellano como Figura anexo 1-5.

Figura anexo 1. MnSOD levels measured by Western Blot.



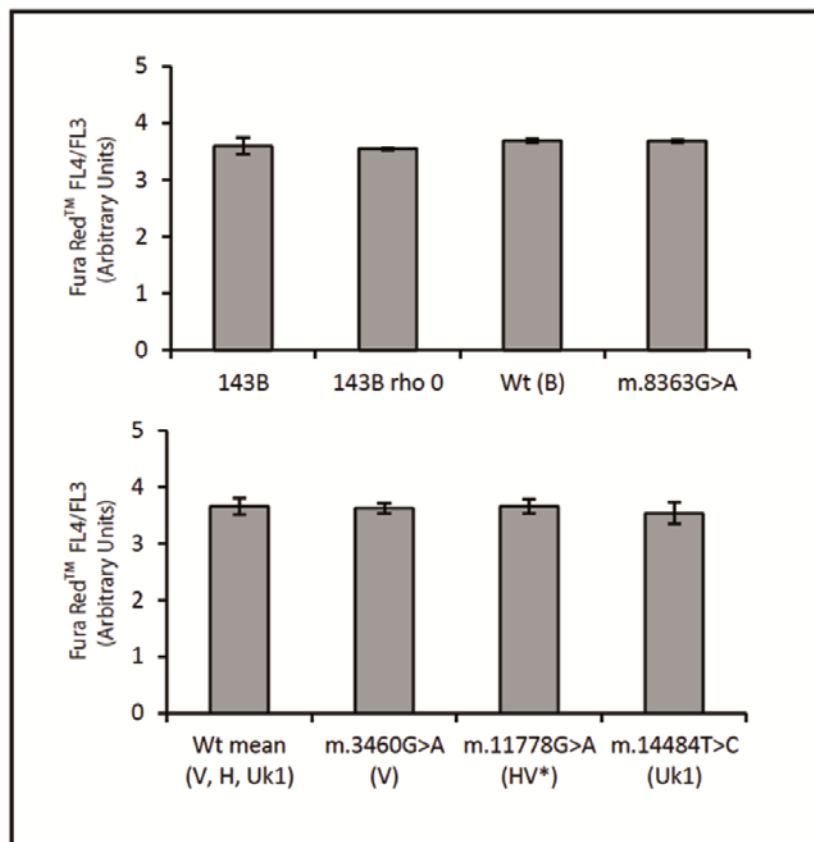
MnSOD expression was analyzed in cells grown in Glucose/Galactose media using specific antibodies from Abcam (ab13533). Tubulin immunodetection (sc-5286, Santa Cruz Biotechnology) was used as a control of protein loading. Appropriate horseradish peroxidase coupled secondary antibodies were used and peroxidase activity was assessed by enhanced chemoluminescence (Amersham). The bars indicate the mean of three different clones. Measurements for each clone were performed in duplicate and the error bars represent the standard deviations. The data were analyzed using one way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, and a P-value <0.05 was considered significant.

Figura anexo 2. Total ATP steady state levels.



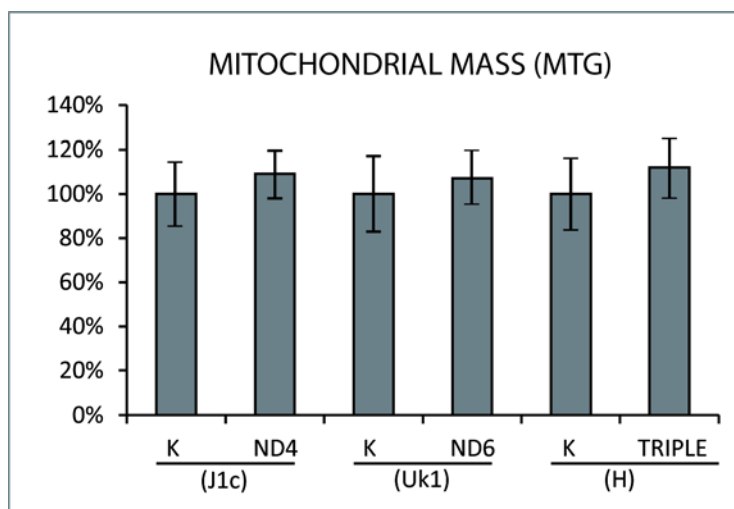
ATP measurements were carried out as follow. 2×10^5 cells were grown for 24 h in glu/gal medium in 35 mm dishes to approximately 80% confluence and then incubated for 2.5 h in a solution (156 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 20mM HEPES, pH 7.35) containing 10 mM glucose. After incubation, cells were washed with PBS and lysed with 1 ml of boiling 100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7.75. Lysates were collected and incubated for 2 min at 100 °C, centrifuged 10 min at 13,000g and 4°C and supernatants frozen. ATP measurement was carried out with an Optocomp I luminometer (MGM instruments Inc), using the ATP bioluminescence assay kit CLS II (Roche Applied Science) according to manufacturer's instructions. ATP levels were calculated with a standard ATP/luminescence curve and normalized by the total amount of protein measured with the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Assays were performed by duplicate in four independent experiments.

Figura anexo 3. Cytoplasmatic Calcium



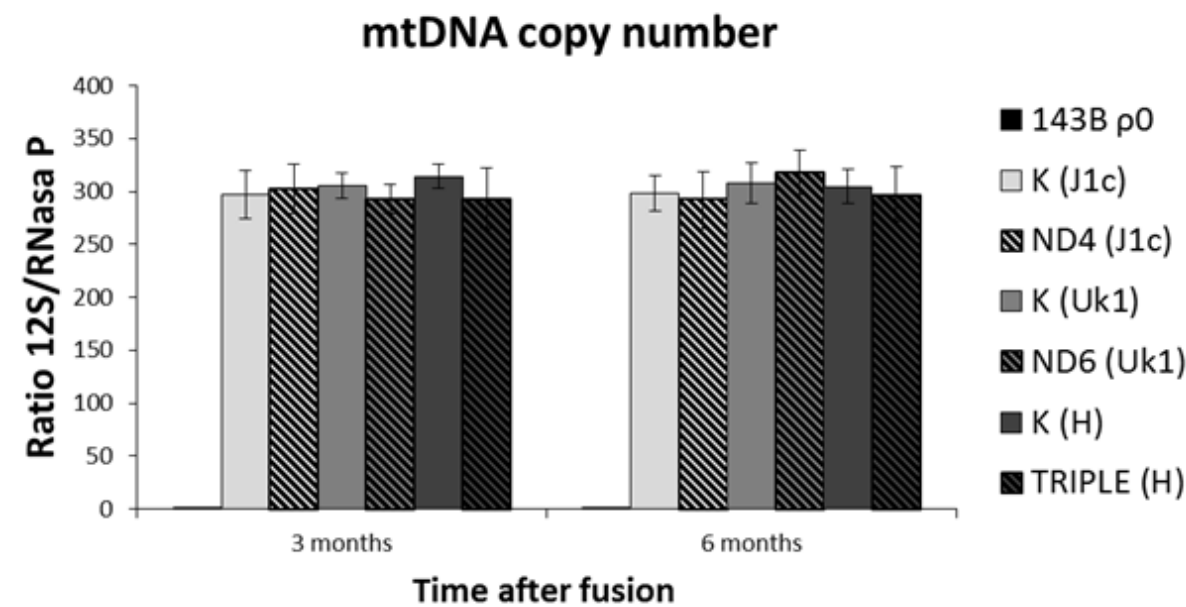
Cytoplasmic calcium has been measured by flow cytometry using Fura red ratiometric probe following manufacturer's recommendations. The data for cybrids harboring mtDNA mutations are the mean of two clones. The three cybrid clones harboring wild type molecules are grouped. Each clone was measured in at least three independent experiments for each parameter and the mtDNA haplogroups are showed in parentheses. The data are the means \pm standard deviation, and they were analyzed using one way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, P value show no significant differences.

Figura anexo 4. Mitochondrial Mass measured by Mitotracker Green (MTG).



The mitochondrial mass was evaluated with the fluorescent probe MitoTracker Green (MTG, Invitrogen). For these assays, 0.75×10^5 cells were grown in Glu/Gal DMEM. After addition of the fluorophore (100nM MTG) and incubation at 37°C for 30 min in the dark, the cells were collected in Glu/Gal DMEM and analyzed immediately with a Cytomic FC500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter). Forward and side scatter were used to gate the viable population of cells, and the mean fluorescence intensity was determined with MXP software (Beckman Coulter). Experiments were performed in duplicate on at least three independent passages.

Figura anexo 5. mtDNA copy number.



mtDNA levels has been measured by QPCR using specific primers for 12S and RNasaP genes in a multiplex reaction. Each cybrid clone was measured in triplicate. The mtDNA haplogroups are showed in parentheses. The data are the means for two clones \pm standard deviation, and they were analyzed using one way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, P value show no significant differences.

